



**Universidade de Évora - Instituto de Investigação e Formação Avançada**

**Programa de Doutoramento em Ciências Veterinárias**

Tese de Doutoramento

**Caraterização da Peeira ovina na região do Alentejo**

Pedro Miguel Cunha Caetano

Orientador(es) | Fernanda P. M. Peixe

Sandra Maria Branco

Évora 2021

---

---

---

---



**Universidade de Évora - Instituto de Investigação e Formação Avançada**

Programa de Doutoramento em Ciências Veterinárias

Tese de Doutoramento

**Caraterização da Peeira ovina na região do Alentejo**

Pedro Miguel Cunha Caetano

Orientador(es) | Fernanda P. M. Peixe

Sandra Maria Branco

Évora 2021

---

---

---

---



A tese de doutoramento foi objeto de apreciação e discussão pública pelo seguinte júri nomeado pelo Diretor do Instituto de Investigação e Formação Avançada:

- Presidente | Rita Payan-Carreira (Universidade de Évora)
- Vogais | Ana Cláudia Correia Coelho (Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro)  
Elvira Sales-Baptista (Universidade de Évora)  
Helena Maria Vala Correia (Instituto Politécnico de Viseu - Escola Superior Agrária)  
Hélder Miranda Pires Quintas (Instituto Politécnico de Bragança - Escola Superior Agrária de Bragança)  
Sandra Maria Branco (Universidade de Évora) (Orientador)

## Resumo

A peeira é uma doença bastante contagiosa e corresponde à principal causa de claudicação em ovinos. A esta doença é atribuída enorme relevância do ponto de vista económico e de bem-estar animal. Apesar de já ter sido amplamente estudada por todo o mundo, as publicações sobre a doença no Alentejo são escassas. Assim, os principais objetivos deste trabalho foram identificar fatores de risco para a doença nesta região e caracterizar a existência de lesões em rebanhos de ovinos.

A aplicação dos *Inquéritos de Validação* permitiu aferir que os produtores de ovinos possuem elevada capacidade de distinguir as lesões de peeira de outras afeções podais. Os *Inquéritos Epidemiológicos* aplicados demonstraram uma prevalência estimada de 34,5% para a peeira. A distribuição da doença não é regionalmente homogénea, apresentando valores superiores no Alto Alentejo. A análise dos resultados permitiu identificar vários fatores de risco, onde se destacam: maior dimensão do efetivo; concentração das épocas de partos; pastoreio em áreas de baixa altitude e com fraca capacidade de drenagem. Relativamente às opções terapêuticas, a utilização do pedilúvio e da antibioterapia tópica estão associadas a uma maior proporção de animais afetados, enquanto a separação dos animais doentes exibiu efeito protetor. A análise bioclimática revelou que a pluviosidade constitui o principal fator de risco para a doença.

A classificação lesional realizada nos ovinos confirmou a natureza dinâmica da peeira. De facto, a proporção de animais afetados em cada efetivo foi bastante variável, estando dependente da precipitação registada antes de cada visita. Os animais que se revelaram mais resistentes à doença foram as fêmeas, os mais jovens e os de raça merina preta.

Nas lesões mais severas registou-se uma maior probabilidade de deteção dos agentes *D. nodosus* e *F. necrophorum*, sendo-lhes atribuído o papel de precursor da doença e de agente oportunista secundário, respetivamente.

## **Title: Characterization of ovine footrot in the Alentejo region**

### **Abstract**

Footrot is a very contagious disease, representing the main cause of lameness in sheep. It is attributed a huge economic and animal welfare impact to footrot. Although it has been widely studied all over the world, research in Alentejo has been scarce. Thus, the main purposes of this study were to perform the identification of risk factors associated with the disease and to characterize the existence of foot lesions in sheep flocks of Alentejo.

The implementation of *Validation Surveys* has enabled us to conclude that sheep producers in Alentejo have a globally high capacity to differentiate footrot lesion from other hoof disorders. *Epidemiological surveys* applied to a significant number of flocks revealed an estimated prevalence of 34.5%. Even though, the distribution of the disease is not similar across the whole region, exhibiting higher values in Alto Alentejo. The results analysis made it possible to identify several risk factors, where we can highlight: greater size of the sheep flock; concentration of lambing periods; grazing in lowland areas and with weak drainage capability. Regarding therapeutics, the use of footbath or topical antibiotics increased the proportion of affected animals, while the separation of sick animals exhibited a protective effect. Bioclimatic analysis revealed that precipitation is the main risk factor to footrot.

The categories of foot scores carried out in sheep confirmed the dynamic nature of footrot. The proportion of animals affected in each herd was quite variable, being highly dependent on the rainfall recorded before each classification period. The animals that proved to be more resistant to disease were females, young and the ones belonging to *merina preta* breed.

The most severe lesions revealed an increasing possibility of detecting bacteria *D. nodosus* and *F. necrophorum*, being attributed the roles of disease precursor and secondary opportunist, respectively to both agents.

# Índice Geral

Resumo.....	I
Abstract .....	II
Índice de Tabelas.....	VIII
Índice de Gráficos.....	XI
Índice de Figuras .....	XII
Lista de Abreviaturas.....	XIII
Apresentações e publicações no âmbito da tese.....	XIV
Agradecimentos .....	XV
Introdução geral .....	1
Capítulo 1 – Revisão bibliográfica sobre a peeira em ovinos.....	4
1.1 – Abstract .....	4
1.2 – Introduction.....	4
1.3 – Aetiology.....	5
1.4 – Pathogenesis .....	6
1.5 – Risk factors associated with footrot.....	7
1.6 – Clinical signs .....	8
1.7 – Diagnosis .....	8
1.8 – Classifications of footrot .....	10
1.9 – Classifications of <i>D. nodosus</i> .....	11
1.10 – Treatment.....	12
1.11 – Control.....	15
1.12 – Eradication.....	16
1.13 – Vaccination.....	17
1.14 – Genetic improvement .....	18
1.15 – Conclusion .....	18
Capítulo 2 – Avaliação da capacidade de reconhecimento de lesões de peeira pelos produtores de ovinos do Alentejo .....	20
2.1 – Introdução .....	20

2.2 – Metodologia .....	22
2.2.1 – Elaboração do <i>Inquérito de Validação</i> .....	22
2.2.2 – Determinação da dimensão da amostra .....	23
2.2.3 – Aplicação do <i>Inquérito de Validação</i> .....	23
2.2.4 – Análise de dados.....	24
2.3 – Resultados .....	24
2.3.1 – Caracterização da amostra.....	24
2.3.2 – Reconhecimento de lesões de peeira .....	24
2.3.3 – Tipologia das lesões existentes nas explorações .....	26
2.3.4 – Correlação entre a presença de peeira e outras lesões podais .....	28
2.4 – Discussão .....	29
2.5 – Conclusão .....	33
Capítulo 3 – Identificação de fatores de risco para a ocorrência de peeira em explorações de ovinos no Alentejo .....	35
3.1 – Introdução .....	35
3.2 – Metodologia .....	38
3.2.1 – População considerada no estudo .....	38
3.2.2 – Determinação da dimensão da amostra .....	38
3.2.3 – Elaboração do questionário epidemiológico.....	39
3.2.4– Recolha de dados .....	39
3.2.5 – Análise dos dados.....	40
3.2.6 – Identificação de fatores de risco relacionados com a exploração e com as particularidades do tipo de manejo implementado .....	41
3.2.7 – Identificação de fatores de risco relacionados com a prevenção e tratamento da doença.....	45
3.3 – Resultados .....	46
3.3.1 – Caracterização da amostra.....	46
3.3.2 – Caracterização das explorações inquiridas .....	47
3.3.3 – Caracterização da doença nas explorações.....	49
3.3.4 – Determinação de fatores de risco relacionado com o tipo de manejo – Análise univariada.....	51
3.3.5 – Determinação de fatores de risco relacionado com o tipo de manejo – Análise multifatorial.....	56
3.3.6 – Prevenção e tratamento de peeira .....	57

3.3.6.1 – Pedilúvio .....	58
3.3.6.2 – Vacinação .....	59
3.3.6.3 – Análise multivariada .....	60
3.4 – Discussão .....	61
3.5 – Conclusão .....	71
Capítulo 4 – Caracterização bioclimática e análise de agregados espaciais da peeira no Alentejo .....	73
4.1 – Introdução .....	73
4.2 – Metodologia .....	75
4.2.1 – Georreferenciação das explorações da amostra.....	75
4.2.2 – Obtenção de dados bioclimáticos .....	75
4.2.3 – Análise univariada entre as biovariáveis e a presença de peeira.....	77
4.2.4 – Desenvolvimento e validação de modelos multifatoriais .....	77
4.2.5 – Construção de mapas de probabilidades .....	78
4.2.6 – Análise de agregados espaciais .....	79
4.3 – Resultados .....	79
4.3.1 – Caracterização da amostra.....	79
4.3.2 – Análise univariada .....	82
4.3.3 – Construção de modelos de regressão logística – análise multivariada.....	84
4.3.4 – Validação dos modelos.....	87
4.3.5 – Construção de mapas de probabilidade.....	88
4.3.6 – Análise de agregados espaciais .....	90
4.4 – Discussão .....	91
4.5 – Conclusão .....	97
Capítulo 5 – Caracterização clínica da peeira ovina em explorações do Alentejo.....	99
5.1 – Introdução .....	99
5.2 – Metodologia .....	102
5.2.1 – Seleção das explorações.....	102
5.2.2 – Visitas às explorações.....	104
5.2.3 – Inspeção dos dígitos e classificação das lesões de peeira.....	107
5.2.4 – Recolha de amostras .....	110
5.2.5 – Obtenção de dados referentes aos fatores climáticos.....	111

5.2.6 – Análise de dados.....	111
5.2.7 – Identificação de fatores de risco para a presença de lesões de peeira .....	111
5.2.8 – Critérios de classificação para a análise .....	114
5.2.8.1 – Classificação ao nível do animal.....	114
5.2.8.2 – Classificação ao nível da exploração .....	114
5.3 – Resultados .....	115
5.3.1 – Caracterização da amostra selecionada.....	115
5.3.2 – Amostra com todas as observações.....	120
5.3.2.1 – Distribuição das lesões.....	121
5.3.2.2 – Análise dos fatores individuais relacionados com a peeira.....	123
5.3.2.3 – Análise multifatorial dos fatores individuais e de grupo relacionados com a observação de lesões de peeira .....	125
5.3.2.4 – Análise comparativa entre explorações .....	127
5.3.3 – Amostra relativa aos animais que tiveram duas observações .....	130
5.3.3.1 – Distribuição das lesões pelos membros .....	131
5.3.3.2 – Análise comparativa entre explorações .....	133
5.3.3.3 – Estatuto clínico de peeira nas explorações .....	134
5.4 – Discussão .....	136
5.5 – Conclusão .....	151
Capítulo 6 – Relação entre os graus de severidade das lesões de peeira e a presença dos agentes <i>D. nodosus</i> e <i>F. necrophorum</i> .....	153
6.1 - Introdução.....	153
6.2 – Metodologia .....	155
6.2.1 – Recolha de amostras nas úngulas dos ovinos .....	155
6.2.2 – Processamento laboratorial das amostras recolhidas .....	157
6.2.3 – Análise estatística dos dados obtidos .....	157
6.3 – Resultados .....	157
6.3.1 – Análise de acordo com a classificação lesional .....	158
6.3.2 – Análise dos resultados ao nível da exploração.....	161
6.3.3 – Análise da virulência das estirpes de <i>D. nodosus</i> .....	163
6.3.4 – Análise dos serogrupos das estirpes de <i>D. nodosus</i> .....	163
6.4 – Discussão .....	165
6.5 – Conclusão .....	174

Conclusão geral e perspectivas futuras .....	176
Bibliografia .....	183
Anexo 1 – <i>Inquérito de Validação</i> (aplicado aos produtores).....	200
Anexo 2 – Compilação de imagens de lesões podais (anexo do <i>Inquérito de Validação</i> ) .....	202
Anexo 3 – <i>Inquérito Epidemiológico</i> (aplicado aos produtores) .....	212
Anexo 4 – Ficha de trabalho de campo .....	216

## Índice de Tabelas

Tabela 2.1 – Respostas corretas para as imagens relativas aos quatro <i>scores</i> lesionais de peeira (n=61) .....	24
Tabela 2.2 – Respostas corretas para as imagens de DDCO, granuloma digital, abcesso podal e doença da linha branca (n=61).....	25
Tabela 2.3 – Número de respostas incorretas no diagnóstico de peeira (n=61) .....	25
Tabela 2.4 – Explorações com peeira em que foram identificados os diferentes <i>scores</i> lesionais, segundo os dois critérios.....	26
Tabela 2.5 – Explorações em que foram observados animais com dermatite interdigital, DDCO, granuloma digital, abcesso podal e doença da linha branca (n=57).....	28
Tabela 2.6 – Análise univariada entre a ocorrência de peeira e restantes lesões podais nas explorações .....	28
Tabela 3.1 – Correspondência entre as sub-regiões e os ADS's do Alentejo .....	40
Tabela 3.2 – Distribuição dos inquéritos respondidos por ADS, número de explorações existentes e respetiva fração correspondente.....	47
Tabela 3.3 – Motivos apresentados para não responder ao inquérito.....	47
Tabela 3.4 – Estatísticas descritivas referentes às variáveis <i>área total, área dos animais e efetivo</i> .....	48
Tabela 3.5 – Raças mais frequentes nas explorações de ovinos do Alentejo .....	49
Tabela 3.6 – Proporção de ovinos com expressão clínica de peeira no ano de 2016.....	50
Tabela 3.7 – Análise univariada dos fatores da exploração e a sua relação com a ocorrência de peeira (variáveis significativas ( $p \leq 0,05$ )) .....	53
Tabela 3.8 – Análise univariada dos fatores da exploração e a sua relação com a ocorrência de peeira (variáveis sem significância ( $p > 0,05$ )) .....	55
Tabela 3.9 – Modelo multifatorial final para os fatores de manejo ( <i>logit</i> ; n=684).....	56
Tabela 3.10 – Matriz de frequências cruzadas do modelo multifatorial referente aos fatores de manejo.....	56
Tabela 3.11 – Parâmetros epidemiológicos do modelo multifatorial referente aos fatores de manejo.....	56
Tabela 3.12 – Ações de prevenção para a peeira realizadas nas explorações que não reportaram casos clínicos (n=451) .....	57
Tabela 3.13 – Ações preventivas e terapêuticas para a peeira realizadas nas explorações que reportaram casos clínicos (n=238) .....	58
Tabela 3.14 – Finalidade da implementação do pedilúvio.....	58
Tabela 3.15 – Número de compartimentos do pedilúvio .....	58
Tabela 3.16 – Comprimento total do pedilúvio .....	58
Tabela 3.17 – Tipo de piso do pedilúvio (n=200) .....	59
Tabela 3.18 – Localização do pedilúvio (n=200) .....	59
Tabela 3.19 – Frequência de vacinação ao longo de um ano .....	60
Tabela 3.20 – Modelo multifatorial para as opções terapêuticas/preventivas ( <i>logit</i> ordenado, n=238) .....	60
Tabela 4.1 – Designação das 14 variáveis bioclimáticas consideradas ( <i>WorldClim 2.0</i> ).....	76

Tabela 4.2 – Estatísticas descritivas referentes às 21 biovariáveis.....	81
Tabela 4.3 – Variáveis relacionadas com a temperatura ( <i>WorldClim</i> ) que apresentam correlação estatística com a ocorrência de peeira (valor $p < 0,05$ ) .....	82
Tabela 4.4 – Variáveis relacionadas com a precipitação ( <i>WorldClim</i> ) que apresentam correlação estatística com a ocorrência de peeira (valor $p < 0,05$ ) .....	82
Tabela 4.5 – Diferença entre médias (presença/ausência de peeira) para as 11 variáveis significativas na análise univariada ( <i>WorldClim</i> ).....	83
Tabela 4.6 – Variáveis climáticas ( <i>E-Obs</i> ) que apresentam correlação estatística com a ocorrência de peeira nas explorações (valor $p < 0,05$ ) .....	83
Tabela 4.7 – Diferença entre médias (presença/ausência de peeira) para as quatro variáveis climáticas ( <i>E-Obs</i> ) .....	83
Tabela 4.8 – Variável relacionada com o tipo de solo que apresenta correlação estatística com a presença de peeira nas explorações (valor $p < 0,05$ ) .....	84
Tabela 4.9 – Diferença entre médias (presença/ausência de peeira) para o teor de argila.....	84
Tabela 4.10 – Modelo multifatorial nº 1 para a ocorrência de peeira (12 variáveis) .....	85
Tabela 4.11 – VIF e valor de tolerância para as cinco variáveis que têm $VIF < 10$ .....	85
Tabela 4.12 – Modelo multifatorial nº 2 para a ocorrência de peeira (3 variáveis) .....	86
Tabela 4.13 – Coeficiente de correlação de <i>Pearson</i> entre as variáveis do modelo nº 2 .....	86
Tabela 4.14 – Modelo multifatorial nº 3 para a ocorrência de peeira (6 variáveis) .....	87
Tabela 4.15 – Comparação entre os parâmetros epidemiológicos dos três modelos.....	87
Tabela 4.16 – Matriz de frequências cruzadas (Modelo nº1) .....	87
Tabela 4.17 – Matriz de frequências cruzadas (Modelo nº2) .....	87
Tabela 4.18 – Matriz de frequências cruzadas (Modelo nº3) .....	87
Tabela 4.19 – Análise de agregados espaciais de peeira em explorações do Alentejo .....	91
Tabela 4.20 – Diferença entre médias, comparando a região de Montemor-o-Novo com o resto da região Alentejo, para as variáveis relativas à precipitação .....	96
Tabela 5.1 – Localização, ao nível do concelho e da freguesia, das 17 explorações visitadas .	103
Tabela 5.2 – Datas em que foram realizadas as visitas às 17 explorações .....	105
Tabela 5.3 – Variáveis incluídas no modelo multivariado inicial ( $n=24$ ) .....	113
Tabela 5.4 – Distribuição percentual dos <i>scores</i> máximos nas diferentes formas clínicas de peeira (segundo Raadsma & Egerton (2013) – Critério A).....	115
Tabela 5.5 – Estatuto clínico de peeira das explorações (segundo Frosth <i>et al.</i> (2015) – Critério B) .....	115
Tabela 5.6 – Estatísticas descritivas referentes às variáveis <i>área total, área dos animais e efetivo</i> ( $n=17$ ) .....	116
Tabela 5.7 – Presença/ausência dos atributos relacionadas com o manejo e com a própria exploração ( $n=17$ ) .....	116
Tabela 5.8 – Estratégias de prevenção e tratamento utilizadas em cada exploração ( $n=17$ ) ..	117
Tabela 5.9 – Número de ovinos inspecionados em cada exploração no 1º ano do estudo .....	117
Tabela 5.10 – Número de ovinos inspecionados em cada exploração no 2º ano do estudo ...	117
Tabela 5.11 – Estado produtivo das ovelhas, em cada visita.....	118
Tabela 5.12 – Raças a que pertencem os animais observados .....	118
Tabela 5.13 – Classes de idades dos animais observados, em cada visita.....	119
Tabela 5.14 – Estatísticas descritivas para a condição corporal, hematócrito e proteínas totais .....	119

Tabela 5.15 – Valores de precipitação e temperatura média verificados nas seis semanas que antecederam as visitas às explorações .....	120
Tabela 5.16 – Comparação entre as classificações lesionais obtidas nas 1ª e 2ª visitas, no primeiro ano de estudo.....	120
Tabela 5.17 – Comparação entre as classificações lesionais obtidas nas 1ª e 2ª visitas, no segundo ano de estudo.....	121
Tabela 5.18 – Distribuição das lesões de peeira pelos membros .....	121
Tabela 5.19 – Distribuição do número de membros que apresentaram lesões de peeira ( $\geq 2$ ) e lesões severas ( $\geq 3$ ) .....	121
Tabela 5.20 – Análise univariada dos fatores individuais e a sua relação com a ocorrência de lesões de peeira .....	124
Tabela 5.21 – Regressão linear entre as análises sanguíneas e a presença de lesões de peeira (n=3049) .....	124
Tabela 5.22 – Análise entre os fatores climáticos e a percentagem de animais com peeira, pelo modelo de regressão linear (n=34) .....	125
Tabela 5.23 – Modelo multifatorial para presença/ausência de lesões de peeira nos ovinos ( <i>logit</i> ).....	126
Tabela 5.24 – Matriz de frequências cruzadas do modelo multifatorial (n=3330).....	126
Tabela 5.25 – Parâmetros epidemiológicos do modelo multifatorial (n=3330) .....	126
Tabela 5.26 – Distribuição dos ovinos por grau lesional nas explorações avaliadas no primeiro ano da análise.....	127
Tabela 5.27 – Distribuição dos ovinos por grau lesional nas explorações avaliadas no segundo ano da análise.....	128
Tabela 5.28 – Análise da presença/ausência de lesões de peeira nas duas visitas .....	131
Tabela 5.29 – Combinação dos graus lesionais registados nas duas visitas, para cada membro .....	131
Tabela 5.30 – Análise conjunta dos critérios A e B para a definição do estatuto clínico da peeira para as explorações.....	134
Tabela 5.31 – Ordenação, em classes, das explorações de acordo com a percentagem de animais que exibiu lesões de peeira em alguma das observações .....	135
Tabela 6.1 – Detecção de <i>D. nodosus</i> e <i>F. necrophorum</i> nas explorações avaliadas em 2017, considerando os <i>scores</i> das amostras.....	161
Tabela 6.2 – Detecção de <i>D. nodosus</i> e <i>F. necrophorum</i> nas explorações avaliadas em 2018, considerando os <i>scores</i> das amostras.....	162
Tabela 6.3 – Análise de regressão linear entre o <i>score</i> médio das amostras recolhidas em cada exploração e a deteção dos agentes <i>D. nodosus</i> e <i>F. necrophorum</i> (%; n=17).....	162

## Índice de Gráficos

Gráfico 2.1 - Distribuição dos erros de diagnóstico nas explorações com peeira (n=22; %) .....	26
Gráfico 2.2 - Distribuição dos erros de diagnóstico nas explorações sem peeira (n=39; %) .....	26
Gráfico 2.3 - Percentagem de explorações com peeira em que foram identificados os diferentes <i>scores</i> lesionais, segundo os dois critérios .....	27
Gráfico 3.1 – Distribuição das explorações de acordo com a área total (ha; n=686) .....	48
Gráfico 3.2 – Distribuição das explorações de acordo com a área dos animais (ha; n=681).....	48
Gráfico 3.3 – Distribuição das explorações de acordo com a dimensão do efetivo (n=687).....	48
Gráfico 3.4 – Histograma contendo o número de explorações que apresentaram casos de peeira ao longo dos meses do ano de 2016.....	51
Gráfico 3.5 – Histograma revelando o período (em anos) desde que se iniciou o protocolo vacinal (nº absoluto; n=81) .....	59
Gráfico 4.1 – Matriz de correlação para as 17 variáveis, baseado nos valores de $ r $ .....	84
Gráfico 5.1 – Distribuição dos membros afetados com lesões de peeira (A, n=513) e lesões severas (B, n=198) .....	122
Gráfico 5.2 – <i>Scores</i> totais dos ovinos que têm lesões de peeira em três ou quatro membros (n=79) .....	122
Gráfico 5.3 – Distribuição percentual dos <i>scores</i> máximos observados em cada uma das visitas realizada, no 1º ano do estudo .....	128
Gráfico 5.4 – Distribuição percentual dos <i>scores</i> máximos observados em cada uma das visitas realizada, no 2º ano do estudo .....	129
Gráfico 5.5 – Percentagem de ovinos que apresentaram lesões de peeira (verde) e lesões graves de peeira (azul) em cada uma das visitas que decorreram durante o primeiro ano ....	129
Gráfico 5.6 – Percentagem de ovinos que apresentaram lesões de peeira (verde) e lesões graves de peeira (azul) em cada uma das visitas que decorreram durante o segundo ano.....	130
Gráfico 5.7 – Evolução dos <i>scores</i> entre as duas visitas, em cada membro (valor absoluto)...	132
Gráfico 5.8 – Percentagem de ovinos que apresentou lesões de peeira em pelo menos uma das visitas (n=1483) .....	133
Gráfico 5.9 – Percentagem de ovinos que apresentou lesões severas de peeira em pelo menos uma visita (n=1483).....	134
Gráfico 6.1 – Percentagem de amostras em que se detetou <i>D. nodosus</i> , de acordo com o <i>score</i> de peeira .....	158
Gráfico 6.2 – Percentagem de amostras em que se detetou <i>F. necrophorum</i> , de acordo com o <i>score</i> de peeira .....	159
Gráfico 6.3 – Distribuição percentual das diferentes combinações dos resultados (deteção, ou ausência de deteção, de <i>D. nodosus</i> e/ou <i>F. necrophorum</i> ), de acordo com o <i>score</i> lesional .	160
Gráfico 6.4 – Distribuição percentual dos diferentes serogrupos de <i>D. nodosus</i> (n=29) .....	164

## Índice de Figuras

Figura 3.1 – Comportamento de agregação dos ovinos no montado alentejano durante os meses de Verão (fotografia original).....	64
Figura 4.1 – Localização geográfica das explorações que em 2016 registaram (verde) ou não (vermelho) casos de peeira .....	80
Figura 4.2 – Localização geográfica das explorações com casos de peeira, segundo o grau de severidade .....	81
Figura 4.3 – Mapa de probabilidade de ocorrência de peeira segundo os modelos 2 (A) e 3 (B) .....	88
Figura 4.4 – Localização das explorações classificadas com VP, VN, FP e FN segundo os modelos 2 (A) e 3 (B).....	89
Figura 4.5 – Mapa de probabilidade de ocorrência de peeira no Alentejo, segundo o modelo 2 .....	89
Figura 4.6 – Mapa de probabilidade de ocorrência de peeira no Alentejo, segundo o modelo 3 .....	89
Figura 4.7 – Identificação de potenciais <i>hotspots</i> para a peeira na análise territorial .....	90
Figura 5.1 – Localização geográfica das 17 explorações visitadas .....	104
Figura 5.2 – Tronco de contenção utilizado para classificação das lesões de peeira (Fonte: Olifants LBA/ ACOS).....	107
Figura 5.3 – Lavagem das úngulas com pulverizador (Fonte: Olifants LBA/ ACOS).....	108
Figura 5.4 – Observação minuciosa das úngulas do ovino (Fotografia original).....	108
Figura 5.5 – Imagem representativa do <i>score</i> 0 (Fotografia original) .....	109
Figura 5.6 – Imagem representativa do <i>score</i> 1 (Fotografia original) .....	109
Figura 5.7 – Imagem representativa do <i>score</i> 2 (Fotografia original) .....	109
Figura 5.8 – Imagem representativa do <i>score</i> 3 (Fotografia original) .....	109
Figura 5.9 – Imagem representativa do <i>score</i> 4 (Fotografia original) .....	109
Figura 5.10 – Localização geográfica das explorações de acordo com as classes de prevalência .....	135
Figura 6.1 – Procedimento de biópsia cutânea (Fotografia de Ricardo Romão) .....	156
Figura 6.2 – Armazenamento das amostras em contentor de azoto líquido (Fotografia de Ricardo Romão) .....	156
Figura 6.3 – Distribuição dos serogrupos identificados por concelho (n=29).....	164

## Lista de Abreviaturas

ACOS – Associação de Agricultores do Sul

ADS – Agrupamento de Defesa Sanitária

*aprB2 – Acidific protease benign 2*

*aprV2 – Acidific protease virulent 2*

CEBAL – Centro de Biotecnologia Agrícola e Agro-alimentar do Alentejo

DGAV – Direção Geral de Alimentação e Veterinária

DRAPAL – Direção Regional de Agricultura e Pescas do Alentejo

FN – Falso Negativo

FP – Falso Positivo

ha – Hectares

IC – Intervalo de confiança

IFAP – Instituto de Financiamento da Agricultura e Pescas

IPMA – Instituto Português do Mar e da Atmosfera

MAD – Membro anterior direito

MAE – Membro anterior esquerdo

MPD – Membro posterior direito

MPE – Membro posterior esquerdo

NUTS – Nomenclaturas das Unidades Territoriais

OR – *Odds-ratio*

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

SIA – Sistema de Identificação Animal

UÉ – Universidade de Évora

VIF – Fator de inflação da variância

VN – Verdadeiro Negativo

VP – Verdadeiro Positivo

VPN – Valor Preditivo Negativo

VPP – Valor Preditivo Positivo

## Apresentações e publicações no âmbito da tese

**Caetano, P.**, Bettencourt, E., Branco, S. (2018). Reviewing footrot in sheep. *Journal of Veterinary Science and Animal Husbandry*. 6(4): 405. ISSN: 2348-9790.

**Caetano, P.**, Branco, S., Monteiro, H., Bettencourt, E., Dias, C., Tábuas, L., Matos, C., Henriques, P. (2018). Identificação de fatores de risco para a ocorrência de peeira em explorações de ovinos na região Alentejo. Poster apresentado nas X Jornadas do Hospital Veterinário Muralha de Évora.

**Caetano, P.** (2019). Avaliação prática de lesões de peeira em ovinos. Palestra apresentada no Workshop: Peeira – Diagnóstico e Prevenção. Universidade de Évora.

**Caetano, P.** (2019). GEN-RES-ALENTEJO – Caracterização epidemiológica da peeira ovina na região. Palestra apresentada nas XX Jornadas da Associação Portuguesa de Buiatria.

## Agradecimentos

De uma forma geral, queria agradecer a oportunidade que me foi concedida em poder colaborar com os trabalhos do projeto GEN-RES-ALENTEJO, uma vez que se tal não tivesse sido possível, não teria tido a oportunidade de desenvolver este trabalho. Deste modo pretendo agradecer a todos os elementos que integraram o projeto, destacando o Doutor Claudino Matos, coordenador de toda a investigação.

À Doutora Sandra Branco por ter aceitado a orientação científica deste doutoramento, por toda a colaboração e dedicação prestadas durante todas as etapas deste desafio, mesmo naquelas que se revelaram mais difíceis.

À Doutora Fernanda Peixe por também ter acedido ao meu pedido para orientar este trabalho nas questões mais técnicas desta pesquisa, apesar de se tratar de uma temática totalmente diferente daquela que está habituada a investigar.

À Doutora Elisa Bettencourt, não só por toda a ajuda que disponibilizou desde que comecei a dedicar-me a estes trabalhos de doutoramento, mas principalmente por todo o apoio que me tem dado desde que comecei a exercer a minha atividade clínica no Hospital Veterinário da Universidade de Évora sob sua supervisão, o que me tem permitido evoluir a nível profissional.

Ao Doutor Pedro Henriques pelas constantes sugestões metodológicas que me permitiram abordar esta investigação de uma forma diferente daquela que havia sido considerada inicialmente.

À Dr<sup>a</sup> Clara Dias e ao Dr. Lino Tábuas por todo o companheirismo e por toda a ajuda que sempre disponibilizaram de forma pronta. Sem o seu incansável contributo não teria sido possível obter uma amostra tão expressiva no que respeita à recolha de inquéritos junto dos produtores de ovinos no Alentejo.

Não sendo possível referir individualmente todos os elementos que integraram a equipa do projeto GEN-RES-ALENTEJO, gostaria de endereçar um agradecimento particular àqueles com quem colaborei de forma mais próxima durante as visitas às explorações, nomeadamente à Doutora Ludovina Padre, ao Doutor Ricardo Romão, à Dr<sup>a</sup> Helena Monteiro, ao Dr. Miguel Madeira e ao Doutor Carlos Bettencourt, para além dos restantes que já foram anteriormente mencionados.

Ao Doutor Telmo Nunes pela incansável cooperação que me permitiu adquirir as competências necessárias para utilizar ferramentas epidemiológicas mais avançadas, que conferiram um valor acrescido ao trabalho realizado.

À Mafalda Mil-Homens por toda a disponibilidade e colaboração que sempre demonstrou, o que me permitiu dar os primeiros passos na análise de dados georreferenciados.

À Eng<sup>a</sup> Catarina Albuquerque por ter fornecido acesso aos resultados das análises laboratoriais e por toda a sua disponibilidade em esclarecer as dúvidas que foram surgindo

Ao Doutor José Rafael pela ajuda, sugestões e conselhos que me dispensou.

À Doutora Elsa Duarte e à Doutora Manuela Vilhena, pela pronta disponibilidade em responderem às várias questões que me foram surgindo no decurso deste trabalho.

A todos os proprietários de explorações de ovinos que aceitaram colaborar com o projeto GEN-RES-ALENTEJO, seja pela resposta aos inquéritos ou pela manifestação de disponibilidade para que se realizassem visitas às suas explorações para monitorizar o efetivo ovino quanto à existência de lesões de peeira.

A todos os colegas médicos veterinários que exercem na área do Alentejo e que auxiliaram na articulação dos contactos com alguns produtores de ovinos, por forma a que pudessem ser incluídos na amostra do estudo.

A todos os alunos de Medicina Veterinária que auxiliaram nos trabalhos práticos relacionados com as visitas às explorações.

Ao Doutor José Tirapicos Nunes, à Doutora Joana Reis e ao Doutor José Ventura, diretores do Hospital Veterinário da Universidade de Évora entre 2016 e a presente data, por terem demonstrado compreensão e por terem permitido que eu conciliasse os meus deveres profissionais enquanto funcionário dessa instituição, com a execução dos trabalhos relacionados com o doutoramento.

A todos os amigos que ao longo destes anos me têm dado força para não desistir a meio desta etapa. Mesmo não estando com todos diariamente, cada um deles ocupou um lugar especial na motivação para a elaboração deste trabalho.

À minha família, em particular aos meus pais e irmãos, por terem acompanhado de perto o processo de redação do presente documento. Agradeço a eles toda a força que sempre me transmitiram para ultrapassar os desafios que a Vida nos coloca. Endereço um agradecimento especial ao meu pai, pelas horas despendidas a fazer a revisão desta dissertação.

À Ana por todo o apoio e compreensão, pelos sacrifícios necessários, mas com a certeza de que a recompensa chegará.

A Deus, que sempre me tem acompanhado!

## Introdução geral

A peeira é uma doença bastante contagiosa que assume uma relevância extrema na espécie ovina. Esta afeição apresenta um forte impacto sobre o bem-estar animal, gerando ainda consequências económicas sobre a rentabilidade das explorações pecuárias que se dedicam à produção de ovinos. Os efeitos nocivos da doença decorrem da evolução dos principais sinais clínicos da mesma, os quais advêm da claudicação. Nas formas mais severas das lesões, a mobilidade dos animais fica seriamente comprometida, impedindo-os de se alimentarem de forma conveniente e, como tal, originando significativas quebras nesta atividade produtiva.

Esta doença tem sido alvo de diversas investigações um pouco por todo o mundo, contudo em Portugal esta afeição não tem sido motivo de muitos estudos, pelo que existe notoriamente uma escassez de publicações científicas que evidenciem o seu contexto epidemiológico e os seus fatores determinantes. No caso particular do Alentejo, vários profissionais que lidam com a espécie ovina no seu quotidiano partilham de uma opinião generalizada de que a peeira afeta um número elevado de animais, não obstante a não existência de dados concretos sobre a real dimensão desta situação. O Alentejo corresponde precisamente à região que no plano nacional alberga um maior número de animais desta espécie, pelo que se torna particularmente pertinente o desenvolvimento de pesquisa orientada para suprir as referidas carências de informação, a fim de quantificar a real dimensão da doença e os impactos que daí decorrem.

Posto isto, cremos estar perante um tema que apresenta todo o interesse em que seja estudado em detalhe. Assim, o desenvolvimento da presente tese de doutoramento surgiu da possibilidade que nos proporcionaram em colaborar de forma ativa nos trabalhos desenvolvidos no âmbito do projeto GEN-RES-ALENTEJO (ALT 20-03-0145-FEDER-000037) – “Utilização de Metodologias Genómicas na Seleção de Ovinos Resistentes à Peeira e a Parasitas Gastrointestinais na Região do Alentejo”. O referido projeto envolveu diversas entidades parceiras, tanto de âmbito regional como nacional. A *Associação de Agricultores do Sul* (ACOS) foi a responsável pela coordenação das tarefas e atividades ao longo das várias etapas no desenvolvimento do projeto, no qual participaram como parceiros a *Universidade de Évora* (UÉ), o *Centro de Biotecnologia Agrícola e Agro-alimentar do Alentejo* (CEBAL), o *Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária* (INIAV) e a *Direção Regional de Agricultura e Pescas do Alentejo* (DRAPAL). O referido projeto foi cofinanciado pelo *Fundo Europeu para o desenvolvimento regional* e pelos programas *Alentejo 2020* e *Portugal 2020*.

Podemos assim referir de forma sumária os principais objetivos que pretendemos alcançar com o decorrer das várias etapas do nosso trabalho: I) avaliar a capacidade dos

produtores de ovinos em reconhecer as lesões de peeira; II) proceder a uma avaliação epidemiológica da doença no Alentejo; III) identificar os fatores de risco para a doença ao nível da exploração; IV) avaliar a influência climática na predisposição geográfica para a existência de casos de peeira; V) caracterizar a afeção e as suas lesões em rebanhos de ovinos existentes na região; VI) relacionar as lesões macroscópicas de peeira com os agentes microbiológicos identificados.

Deste modo, o trabalho efetuado está organizado em torno de três patamares distintos, mas que tratamos de forma articulada, sendo eles a região, a exploração pecuária e o próprio animal. O primeiro nível procura identificar fatores de risco para a doença no Alentejo, enquanto o segundo torna possível proceder a averiguação sobre o modo como a doença se expressa em cada efetivo pecuário. Por fim, o último patamar permite determinar a severidade das lesões em cada animal, sendo possível correlacioná-la com as especificidades das bactérias envolvidas na patogénese da doença.

Os elementos usados na dissertação decorrem, por um lado, da recolha de informação junto dos proprietários das explorações pecuárias e, por outro, da observação clínica dos animais e das análises laboratoriais realizadas com base no material recolhido. As respostas obtidas junto dos produtores foram ainda analisadas conjuntamente com os dados recolhidos em diversas bases de dados que agregam informação edafo-climática, por forma a aprofundar a avaliação de potenciais fatores de risco para a doença.

A presente dissertação está estruturada em seis capítulos, que apesar de serem elementos independentes, seguem uma sequência lógica e encontram-se funcionalmente interligados em torno do objetivo geral do estudo, ou seja, a *Caracterização da Peeira em ovinos na região do Alentejo*. O Capítulo 1 – *Revisão bibliográfica sobre a peeira em ovinos* resulta da compilação que foi feita sobre a bibliografia que aborda este tema, tendo o conteúdo do mesmo sido publicado como artigo de revisão em Caetano *et al.* (2018). Os capítulos seguintes envolvem então as tarefas práticas que foram executadas por forma a alcançar os objetivos a que nos propusemos.

Por forma a sistematizar as tarefas que foram desenvolvidas ao longo das etapas do estudo, começamos por referir que o trabalho prático se iniciou com a aplicação dos *Inquéritos de Validação* junto de produtores de ovinos do Alentejo. Os referidos questionários permitiram avaliar a sua capacidade de diagnosticar lesões podais frequentemente identificadas em ovinos, com particular enfoque na peeira. Os resultados obtidos são apresentados no Capítulo 2 – *Avaliação da capacidade de reconhecimento de lesões de peeira pelos produtores de ovinos do Alentejo*.

As conclusões obtidas com os *Inquéritos de Validação* também permitiram determinar o grau de confiança com que podem ser interpretados os resultados alcançados com base na etapa seguinte. Esta envolveu a formulação dos *Inquéritos Epidemiológicos*, os quais foram respondidos por uma amostra expressiva de produtores da região. A análise dos seus resultados permitiu determinar a existência de potenciais fatores de risco para

a doença nas explorações do Alentejo. Os respetivos resultados estão expostos no Capítulo 3 – *Identificação de fatores de risco para a ocorrência de peeira em explorações de ovinos no Alentejo*.

As respostas aos *Inquéritos Epidemiológicos* serviram ainda como base para o estudo realizado no Capítulo 4 – *Caracterização bioclimática e análise de agregados espaciais da peeira no Alentejo*. Neste, efetuámos um cruzamento entre as coordenadas geográficas de cada uma das explorações consideradas e os dados bioclimáticos disponíveis para cada localização específica. O procedimento referido permitiu identificar correlações entre algumas dessas variáveis e a ocorrência de peeira.

Na etapa seguinte foram selecionadas algumas explorações em que foram reportados casos clínicos da doença, com base nas respostas obtidas nos *Inquéritos Epidemiológicos*. Posteriormente realizaram-se visitas a essas herdades e foram observados os dígitos dos animais desses efetivos, por forma a classificar as lesões de acordo com uma escala de severidade utilizada para a peeira. Estes resultados são tratados no Capítulo 5 – *Caracterização clínica da peeira ovina em explorações do Alentejo*, tendo como propósitos principais avaliar o padrão de expressão lesional dentro das explorações e identificar alguns fatores de risco para a doença, com particular foco naqueles que derivam do próprio hospedeiro.

Por fim, no Capítulo 6 – *Relação entre os graus de severidade das lesões de peeira e a presença dos agentes D. nodosus e F. necrophorum* centrámos a análise na avaliação das correlações entre os graus de severidade das lesões e os resultados microbiológicos revelados nos trabalhos de Albuquerque (2019). Estes resultados foram obtidos a partir de biópsias cutâneas que realizámos durante a avaliação a cada rebanho, tendo os mesmos sido correlacionados com a atribuição dos *scores* lesionais. Esta análise permitiu determinar qual o papel de cada um dos dois principais agentes bacterianos que estão envolvidos na patogénese da doença.

Estamos convictos de que a concretização deste estudo permitirá recolher informação, cientificamente validada, que poderá ser transmitida diretamente aos produtores por forma a melhorar o seu modo de atuação, com especial enfoque na aposta em medidas de biossegurança e em estratégias proativas de monitorização e controlo mais eficazes. O objetivo último será, naturalmente, a minimização do impacto que a peeira tem em ovinos na região Alentejo e a inerente melhoria do bem-estar animal.

# **Capítulo 1 – Revisão bibliográfica sobre a peeira em ovinos**

O conteúdo deste capítulo encontra-se publicado no seguinte artigo de revisão: Caetano, P., Bettencourt, E., Branco, S. (2018) Reviewing Footrot in Sheep. *Journal of Veterinary Science and Animal Husbandry*. 6(4): 405. ISSN: 2348-9790.

## **1.1 – Abstract**

Ovine footrot is the main cause of lameness in sheep around the world and is responsible for extensive economic and welfare impacts. It can be an extremely contagious disease, resulting from the invasion of the interdigital tissue by a complex mixture of bacteria, in which *Dichelobacter nodosus* is a required component. Strains of *D. nodosus* can be benign or virulent, but they are not always related with the clinical expression of footrot, complicating the diagnostic process. Several efforts have been made over recent decades to control the disease, but it remains endemic in the major sheep-raising countries of the world. The use of more efficient therapeutic procedures and better farm management practices or the development of new selective breeding tools and strategic vaccination protocols are some of the key measures that may improve footrot control in the future.

## **1.2 – Introduction**

Ovine footrot is a contagious disease affecting the feet of sheep and other ruminants (Bennett & Hickford, 2011) and presents in two different forms. Interdigital dermatitis is the disease's mildest form and involves inflammation of the interdigital skin. In contrast, severe footrot is much more aggressive, presenting as the separation of the horn from the sensitive layers of the foot, known as underrunning (Winter, 2008).

Footrot has been known of since the early 19<sup>th</sup> century (Graham & Egerton, 1968). In the mid-20<sup>th</sup> century, the virulent or progressive form and the benign or non-progressive form of footrot were identified (Egerton & Parsonson, 1969). A few decades later, Stewart *et al.* (1986) identified a more complex spectrum of virulence among different strains of *D. nodosus*, which could be associated with different clinical expressions of the disease. Nowadays, ovine footrot has been reported on the vast majority sheep-farming countries around the world (Dhungyel *et al.*, 2013b).

The disease has a prejudicial impact on animal welfare, due to pain, discomfort and weight reduction. Consequently, it leads to productivity losses by reducing the number of lambs per ewe, reducing growth rates in lambs and adult sheep and increasing the mortality rate and fertility problems (Stewart *et al.*, 1986; Wassink *et al.*, 2010b). Beyond those losses, the costs of therapeutic, control and preventive measures can be expensive (Winter, 2008). The economic impact is thus extensive, estimated at an annual cost of £24-80 M in the United Kingdom (Nieuwhof & Bishop, 2005; Winter & Green, 2017) and \$18.4 M in Australia (Dhungyel *et al.*, 2014).

Most sheep farmers classify lameness as the condition of most concern in their sheep flocks (Goddard *et al.*, 2006) and consider footrot as the main cause of ovine lameness (Kaler & Green, 2008). It is estimated that approximately 5% of British sheep are lame at any one time (Winter *et al.*, 2015). That lameness is attributed to footrot in 80% of the cases (Kaler & Green, 2008). Footrot has persisted for many decades in British flocks despite all the efforts made to control the disease (Green & George, 2008), though the prevalence of lameness has halved over a period of 10 years, which means the results of recent research are being used to inform farmers about recommended management practices (Winter *et al.*, 2015). Even so, British farmers have been encouraged to keep footrot prevalence at a maximum of 2% (Angell *et al.*, 2018).

### 1.3 – Aetiology

Footrot results from the invasion of the epidermal tissue of the hooves by a complex mixture of bacteria, in which *D. nodosus* is a necessary component (Allworth, 2014). This bacterium was formerly known as *Fusiformis nodosus* (Raadsma & Egerton, 2013) or *Bacteroides nodosus* (Dewhirst *et al.*, 1990) and is a gram-negative, anaerobic bacterium (Raadsma & Egerton, 2013). Unlike other bacteria, *D. nodosus* is not usually found in sheep faeces or in soil (Green & George, 2008). It is possible to find the agent in normal healthy feet, but the load of bacteria present in affected feet is much higher (Witcomb *et al.*, 2014). Thus, disease progression from interdigital dermatitis to severe footrot is mainly attributed to *D. nodosus* (Witcomb *et al.*, 2014).

The role of other bacteria in the pathogenesis of footrot is not fully understood (Bennett & Hickford, 2011), but Roberts & Egerton (1969) found that the presence of *Fusobacterium necrophorum*, a faecal organism, was also required for *D. nodosus* to start an infection in laboratory trials. Research by Bennett *et al.* (2009) found evidence of a synergetic relationship between *F. necrophorum* and *D. nodosus*. More recently, Atia *et al.* (2017) proposed an opportunistic role for this pathogen, as high loads of *F. necrophorum* were only observed once severe footrot had developed. Thus, instead of attributing to *F. necrophorum* the role of precursor in footrot pathogenesis, it is now

believed that this bacterium contributes to both the disease's progression and severity (Witcomb *et al.*, 2014; Atia *et al.*, 2017).

*F. necrophorum* promotes inflammation and damage of the *stratum corneum*. This bacterium also produces toxins that cause necrosis of the superficial layer of the interdigital skin, enabling the establishment of other bacteria, such as spirochetes (Green & George, 2008). *F. necrophorum* is an anaerobic gram-negative bacterium divided in two sub-species, *F. necrophorum* sub-species *necrophorum* and *F. necrophorum* sub-species *funduliforme*. The first one is commonly found in animals, while the second is usually present in humans (Nagaraja *et al.*, 2005). However, Zhou *et al.* (2009b) observed that the variant more frequently found in sheep and goats was different from the two sub-species previously reported, suggesting that much has yet to be learned about this issue.

Other unexpected bacteria such as *Fusobacterium equinum* (Zhou *et al.*, 2009a) and *Bacteroides ureolyticus* have been isolated in footrot lesions (Zhou *et al.*, 2009c). The presence of *B. ureolyticus*-like organisms in footrot lesions may present a problem for diagnosis as this bacterium is phenotypically similar to *D. nodosus* and it is possible that some older researches have mis-identified the agent present in footrot lesions (Zhou *et al.*, 2009c). It is possible to conclude that bacteria other than *D. nodosus* represent an important role in the pathogenesis of the disease, but there is much more to be studied to understand the exact mechanism (Bennett & Hickford, 2011).

Some decades ago it was believed that *Treponema spp.* was also involved in the disease pathogenicity (Raadsma & Egerton, 2013), but one recent study concluded that there was no significant connection between footrot and *Treponema spp.* (Frosth *et al.*, 2015).

## 1.4 – Pathogenesis

Transmission of footrot starts with naturally footrot-infected sheep acting as a source of infection to the feet of healthy animals (Raadsma & Egerton, 2013). However, the infection of healthy interdigital skin of sheep with *D. nodosus* alone is not enough for the development of footrot. The activity of normal environmental microflora present on the interdigital skin, the presence of favorable environment temperatures and the water maceration of the *stratum corneum* of the hoof reflect some of the necessary prerequisites for disease development (Green & George, 2008; Raadsma & Egerton, 2013).

Disease transmission is enhanced by temperatures above 10°C and with consistent rainfall over several weeks, rather than a single short-lived episode of rainfall (Graham & Egerton, 1968). Wet weather increases vulnerability to footrot either by inducing physical changes in the hoof, making it more susceptible, or by changing the biology of

the pathogens that cause footrot (Bennett & Hickford, 2011). Therefore, transmission of footrot is higher during winter when sheep are housed in high animal densities (Green & George, 2008), particularly in clay soil types (Muzafar *et al.*, 2016).

*D. nodosus* can be transmitted between sheep via soil contact (Bennett & Hickford, 2011) and is capable of surviving outside the host for long periods. Myers' *et al.* (2007) investigations revealed that *D. nodosus* could tolerate up to 10 days exposed to air, though more recently Muzafar *et al.* (2016) has shown that it could survive longer than 30 days, despite being an anaerobic bacterium. The duration of infectiousness of the agent outside the hoof depends on climatic conditions (Green & George, 2008) and Muzafar *et al.* (2016) concluded that agent survival was higher at 5°C than at 25°C. *D. nodosus* feeds on collagen present in living dermis, digesting it (Green & George, 2008), and this represents one of the main barriers for the eradication of footrot, since the causative agent has the capability of surviving in the inter-digital skin or in cryptic lesions within the hoof for several months (Bennett & Hickford, 2011).

## **1.5 – Risk factors associated with footrot**

Expression of footrot in the field is determined by three key factors: the virulence of the bacteria involved, environmental conditions and host resistance (Raadsma & Egerton, 2013). Many environmental factors, such as temperature, rain fall or soil type, can affect the disease's progression by leading to injuries to the feet of sheep, thus increasing susceptibility to infection (Atia *et al.*, 2017).

Some management practices are directly associated with an increased likelihood of flocks developing footrot and the probability of sheep developing footrot increases with flock size (Angell *et al.*, 2018). Stocking animals in high densities can create an extremely contaminated environment. The implementation of preventative measures such as quarantining or isolation of diseased animals can drastically reduce environmental contamination for the rest of the flock, decreasing disease prevalence (Green & George, 2008). All factors that can lead to predispose the maceration of the interdigital skin will facilitate colonization of *D. nodosus* (Raadsma & Egerton, 2013). As such, the presence of moist ground with rough pasture in the areas where sheep graze is another risk factor (Angell *et al.*, 2018).

Some non-genetic factors can have a significant influence on susceptibility to footrot. By sex, it has been reported that ewes are more resistant to the disease than rams (Raadsma & Egerton, 2013), while by age, it has been concluded that yearling sheep are much less likely to have footrot than lambs (Angell *et al.*, 2018; Nieuwhof *et al.*, 2008). Some ovine breeds, like Merino, have been shown to be more susceptible to footrot (Emery *et al.*, 1984).

## 1.6 – Clinical signs

The disease is characterized by acute lameness, anorexia, reduced production, reduced wool quality and, in the worst-case scenario, can result in death (Bennett & Hickford, 2011). In the beginning of the infection it is possible to observe an inflammatory process, characterized by erythema and diffuse superficial necrosis of the interdigital skin. If the disease evolves to a more severe phase, a break at the skin-horn junction will be seen. Underrunning, which starts at the heel and the posterior region of the sole, can progress along the sole to the toe. The separation can extend to the abaxial wall of the hoof in the most severe cases (Raadsma & Egerton, 2013). The separation process will create a cavity between the sensitive tissue of the claw and the hoof horn, which will be filled with a grey pasty scum which has a foul smell, characteristic of anaerobic bacterial activity (Green & George, 2008). Sheep with chronic footrot infection tend to present feet with overgrown and misshapen horns and with extensive necrotizing damage through the surrounding soft tissues (Raadsma & Egerton, 2013).

Over recent decades many scoring systems have been developed to establish criteria to differentiate the levels of progression of footrot infection. The first scoring system for footrot lesions was created by Egerton & Roberts (1971) and remains one of most widely implemented classifications to this day:

Score 1: limited, mild interdigital dermatitis;

Score 2: more extensive interdigital dermatitis;

Score 3: severe interdigital dermatitis and underrunning of the horn of the heel and sole;

Score 4: similar to score 3, but with the underrunning extended to the walls of the hoof.

## 1.7 – Diagnosis

The clinical diagnosis of footrot starts by performing a careful visual inspection of the hooves. The most frequent lesions identified visually range from a mild interdigital dermatitis to the underrunning of the sole, according to the disease's stage of development. The differentiation between benign and virulent forms of footrot can be a challenging process in early stages of the disease or if adverse environmental conditions are present (McPherson *et al.*, 2017).

The most significant differential diagnosis of footrot involves ovine contagious interdigital dermatitis, which is a necrotizing infection caused by *F. necrophorum* in the absence of *D. nodosus* (Parsonson *et al.*, 1967). The differentiation of this disease from footrot may be difficult since the appearance of both is similar. Other diseases often mistaken with footrot include white line disease, contagious ovine digital dermatitis and

foot/toe abscesses, although experienced technicians can easily distinguish these from footrot (Winter, 2008). According to Kaler & Green (2008), terminology to describe foot diseases is often used incorrectly, mainly by farmers who tend to identify any hoof horn lesion as footrot.

Definitive diagnosis can only be achieved by the demonstration of *D. nodosus* in gram stain smears collected directly from suspect lesions (Raadsma & Egerton, 2013), as some features displayed by these colonies allow for their differentiation from others (Dhungyel *et al.*, 2014). These bacteria are observed as large Gram-negative rods [0,6-0,8  $\mu\text{m}$  wide and 3-10  $\mu\text{m}$  in length] and can be straight or slightly curved, presenting a characteristic enlargement at the ends (Dhungyel *et al.*, 2014).

Microbiological culture of *D. nodosus* is an expensive and laborious process that requires specialized equipment (Wani & Samantha, 2006) and can be particularly difficult when the sample site is contaminated with other pathogens. As the bacterium is an obligate anaerobe, it requires a specially enriched medium for its isolation, such as hoof agar, trypticase arginine serine agar or *Eugon* agar. Prior to culture, these media need to be kept in anaerobiosis jars (Ozgen *et al.*, 2015). However, as the culture takes approximately four weeks to yield results – and thus cannot be practically used to segregate infected animals from the rest of the flock – it is rarely used as a diagnostic tool (Wani & Samantha, 2006).

In the recent years, the use of *Polymerase Chain Reaction* (PCR) based methods has grown because of the reliability of results (Frosth *et al.*, 2012). A multiplex PCR is currently used for serogrouping, as it is a simple and rapid technique that may be very useful for vaccination-based footrot control (Dhungyel *et al.*, 2002). Stäuble *et al.* (2014b) developed a real-time PCR that detects the presence of alleles acidific protease virulent 2 (*aprV2*) or acidific protease benign 2 (*aprB2*) directly from clinical samples, constituting a rapid and sensitive diagnostic technique to differentiate between benign and virulent footrot. This technique can detect high loads of virulent strains of *D. nodosus* in clinically healthy sheep. This evidence indicates that the lesion scoring system does not always correlate with bacterial loads and the virulence of *D. nodosus* strains. Nevertheless, McPherson *et al.* (2017) have identified low rates of agreement between clinical diagnosis and PCR test results.

Swabs are used to collect samples directly from the interdigital skin, which can be used both for culturing and PCR analysis (Frosth *et al.*, 2015). This technique is currently considered a better diagnostic approach than biopsy punching (Stäuble *et al.*, 2014a).

## 1.8 – Classifications of footrot

Strains of *D. nodosus* differ in virulence and in their ability to induce clinical disease, being classified as benign, intermediate or virulent strains. For descriptive purposes, these three terms are also used to describe the different clinical forms of footrot (Stewart *et al.*, 1986; Dhungyel *et al.*, 2014). While benign footrot refers to the mildest state of the disease, with the lesions of dermatitis almost exclusively limited to the interdigital skin, virulent footrot is related with a much more severe disease, which frequently progresses to the separation of the soft and hard horn from the underlying hoof matrix, a phenomenon known as underrunning. The expression intermediate footrot refers to all the forms located between benign and virulent footrot (Bennett & Hickford, 2011). Virulent strains of *D. nodosus* commonly lead to a clinical expression of virulent footrot, but it must be recognized that clinical expression of the disease is also dependent on environmental conditions and host factors (Allworth, 2014). Likewise, if favorable climatic conditions are present, benign strains of *D. nodosus* induce severe footrot lesions in a limited proportion of susceptible animals (McPherson *et al.*, 2017).

It is important to clearly determine which form of footrot is present in each flock, since only flocks with virulent footrot may benefit from a control or eradication program. Time and resources should not be expended on cases of intermediate and benign footrot, as they will regress without treatment if environmental conditions become less propitious for the development of footrot. Moreover, the mildest forms of footrot usually have limited economic impacts (Raadsma & Egerton, 2013).

The most precise method for identifying the form of footrot requires examination of a representative number of animals from the whole flock to determine the proportion of sheep presenting score 4 lesions, rather than the presence of footrot lesions of any grade (McPherson *et al.*, 2017). If there is any doubt as to the effect of the environment or about previous treatments, it is recommended to repeat the inspection after a minimum period of two weeks. When virulent footrot is present, it is expected that more than 10% of the animals will have severe lesions. The disease develops very fast and there is little evidence of self-curing. The presence of clinical signs, such as lameness, are associated with huge production losses. In the other hand, in case of benign footrot, less than 1% of the animals will have severe lesions, mostly confined to the interdigital skin (scores 1 or 2). Most such lesions resolve spontaneously with improved environmental conditions (Raadsma & Egerton, 2013).

In contrast to Australian researches, in the UK *D. nodosus* is not typically classified according to virulence but to the presence of key signs of clinical diagnosis, such as lameness or the severity of lesions (Green & George, 2008).

## 1.9 – Classifications of *D. nodosus*

There are several different criteria by which the causal agent of footrot can be classified and the presence of specific virulence factors is one relevant factor used to categorize different strains of *D. nodosus*. Some of the more important virulence factors include its proteases, fimbriae and outer-membrane proteins (Bennett & Hickford, 2011; Kennan *et al.*, 2001). The fimbriae of *D. nodosus* play an important role in virulence expression since they are required for binding to host epithelial cells (Myers *et al.*, 2007), it being generally accepted that virulence is directly proportional to the number of fimbriae present (Billington *et al.*, 1996). The outer membrane proteins of *D. nodosus* interfere with the host's immune response, rather than attacking the host (Myers *et al.*, 2007).

The secretion of extra-cellular proteases by *D. nodosus* plays a vital role in the biology of the agent due to its inability to create any aminoacid. Thus, the bacterium obtains aminoacids by importing them from digested proteins, due to the proteolytic ability of extra-cellular proteases (Myers *et al.*, 2007). The thermostability of these proteases is also deeply related to the expected virulence of the microorganisms (Allworth, 2014). Virulent strains of *D. nodosus* produce heat stable enzymes with caseinolytic activity, while benign strains produce heat labile enzymes (Raadsma & Egerton, 2013). The gelatine gel test is used to identify heat stable proteases, but correlation between the results of this test and the clinical expression of disease can be unreliable (Green & George, 2008; Dhungyel *et al.*, 2013b). Alternatively, the elastase test measures the temporal and quantitative activity of extracellular proteases, and is probably a better option for distinguishing virulent and benign strains of *D. nodosus*, since it has a good correlation with clinical diagnosis (Dhungyel *et al.*, 2013b; McPherson *et al.*, 2017).

In the past, some segments of the *D. nodosus* genome, such as *intA* or *vrl*, were thought to be significant virulence factors (Cheetham *et al.*, 2006), while the genetic segment *intD* was strongly associated with a benign phenotype of *D. nodosus* (Tanjung *et al.*, 2009). However, more recent research has not been able to confirm the hypothesis of the *intA* gene as a virulence factor (Kennan *et al.*, 2014).

More recently, other genetic segments have been considered important virulence factors, such as *aprV2* gene, which encodes the *aprV2*, a thermostable protease. Meanwhile, the orthologous *aprB2* gene, responsible for encoding a thermolabile protease, is present in the genome of *D. nodosus* benign strains (Kennan *et al.*, 2010). The genes *aprV2* and *aprB2* have a single nucleotidic difference (TA/CG) at position 661/662 (Riffkin *et al.*, 1995). It was believed that this difference was responsible for the definition of the elastase activity (Kennan *et al.*, 2010), but McPherson *et al.* (2017) have identified many strains of *D. nodosus* containing the gene *aprV2* in clinically healthy herds, proving the *aprV2* is no longer a reliable virulence marker.

Another classification of *D. nodosus* refers to serogroup, which is related to fimbrial antigenicity and which is important in the development of specific vaccines (Claxton *et al.*, 1983). The serogroup classification is denoted by letters and there are 10 different known serogroups (A-I and M) (Chetwin *et al.*, 1991). These serogroups can further be subdivided into 21 serotypes (A1, A2, B1, B2, B3, B4, B5, B6, C1, C2, D, E1, E2, F1, F2, G1, G2, H1, H2, I and M) according to cross-absorption tests (Bhat *et al.*, 2012). Each region and country have a specific profile of isolation frequencies for the serogroups. Serogroup B is undoubtedly the most frequent serogroup in all the countries. Other frequent *D. nodosus* serogroups are A (Australia), D (Australia, New Zealand and the United Kingdom), G (Australia) and H (Australia and the United Kingdom) (Claxton, 1989). The median number of *D. nodosus* serogroups found in affected hooves is one (Hill *et al.*, 2010), although cases of up to seven different *D. nodosus* strains on a single hoof have been reported (Zhou & Hickford, 2000).

## **1.10 – Treatment**

Different treatment approaches and management methods are used worldwide according to the specific production system in question. The choice of management method depends on the size of the flock, the stocking rate, the availability of medication and other resources and the acceptance of different management and treatment policies within each market (Bennett & Hickford, 2011). Furthermore, some farmers choose not to treat affected animals owing to a belief that treatment is expensive and may not be ultimately profitable (Winter & Green, 2017), though Wassink *et al.* (2010b) have concluded that economic losses will occur if animals are left untreated for seven days or more. Winter & Green (2017) have produced a cost-benefit analysis of different approaches of controlling footrot in 116 sheep flocks and concluded that farms with higher prevalence of lameness had a much higher overall cost per animal per year than farms with lower prevalence rates (£6.53 versus £3.90).

Some of the methods used routinely some years ago to control footrot, such as foot-trimming, are currently associated with higher levels of prevalence and incidence, even when done properly (Green *et al.*, 2007b; Green & Clifton, 2017). Foot-trimming has been used for decades and its goal was to remove diseased tissue and to promote a good hoof conformation (Bennett & Hickford, 2011). This procedure reduces bacterial load, diminishing environment contamination, and exposes deeper tissue to oxygen, which is toxic to anaerobic bacteria. However, the use of foot-trimming needs to be done carefully, as the overuse of foot-trimming may damage the sensitive tissues and induce foot bleeding, leading to lameness (Kaler *et al.*, 2010; Winter *et al.*, 2015). This situation gives infectious agents an opportunity to penetrate the hooves (Wassink *et al.*, 2003). Green *et al.* (2007b) reported that the prevalence of footrot increased after

routine foot-trimming sessions, which suggests that excessive use of trimming may represent a risk factor for disease transmission. In addition, as foot-trimming is a time-consuming practice that requires much physical effort, its cessation could potentially save farmers significant amounts of time and money (Winter & Green, 2017).

The use of foot-bathing can have a beneficial effect in lameness prevention in the initial stages of footrot (Winter *et al.*, 2015), but the recommended procedures cannot be easily implemented in the vast majority of commercial farms as each sheep should remain inside the footbath for 10 minutes once a week (Greber *et al.*, 2016). Moreover, following treatment, all animals need to be moved to an area that has been free of other animals for a minimum period of two weeks (Wassink *et al.*, 2003). Another disadvantage of footbathing is that the vast majority of chemical solutions used are toxic both to the environment and to the people applying them (Szponder *et al.*, 2017), with such solutions also often contain copper salts, zinc sulphate and formalin, which can be painful for animals (Raadsma & Egerton, 2013), though it is believed there are possible alternatives to these chemical solutions. Winter *et al.* (2015) performed a study based on 1260 postal questionnaires received from British farmers and concluded that the use of footbathing in sheep presenting interdigital dermatitis has a beneficial effect preventing disease progression, as disinfectants can inactivate surface pathogens. However, footbathing was not found to be effective against cases of severe footrot, as footbath solutions cannot penetrate deep into affected tissues.

According to Winter & Green (2017), it is extremely important to persuade both farmers and veterinarians to discontinue outdated procedures that are inefficient, physically difficult and time-consuming in favor of currently recommended methods. Even though there are many farms that have altered their routine procedures, a significant number of farmers continue to regularly practice hoof-paring on their sheep, against the advice of recent research (O’Kane *et al.*, 2017). Farmers that follow the most up-to-date recommendations for reducing the prevalence of lameness in sheep have significantly lower expenses per animal than those who do not use such management methods (Winter & Green, 2017). These recommendations discourage whole-flock interventions, which are expensive and considered ineffective in reducing lameness, and focus on the early treatment of affected animals with antibiotics, which is associated with lower costs and higher treatment effectiveness in footrot (Wassink *et al.*, 2010b; Winter *et al.*, 2015).

Winter & Green (2017) investigated the cost-benefit of different strategies to treat ovine footrot in 116 English flocks and concluded that prompt treatment of lame ewes with parenteral antibiotics is the most efficient and cost-effective strategy. However, straight extrapolations for different farming scenarios are inadvisable, as treatment effectiveness depends on flock size, footrot prevalence and the pathogenicity of *D. nodosus* strains involved.

There is little evidence for antibacterial resistance in *D. nodosus* (Green & Clifton, 2017), with the microorganism showing in-vitro sensitivity to different antibiotic classes such as tetracyclines, macrolides, penicillin, cephalosporins and fluoroquinolones (Kaler *et al.*, 2012; Strobel *et al.*, 2014). Oxytetracycline has been used effectively in the treatment of footrot for decades (Rendell & Callinan, 1997). Even so, other antibiotic options have been discovered more recently. Strobel *et al.* (2014) compared the efficacy of the use of gamythromycin with oxytetracycline in the treatment of sheep presenting footrot lesions. The difference between treatments was significant, with sheep injected with a single dose of gamythromycin revealing a better clinical cure rate.

The use of systemic antibiotics targets anaerobic bacteria located deep within the feet, reducing inflammation. The effect of medication is rapid and lame sheep can become sound within a period of 3 to 4 days (Green & George, 2008), though poor blood supply to the hoof can reduce the effectiveness of systemic therapy. Thus, the use of topical antibacterial sprays may be a useful option. Local antibiotics have another advantage as they inactivate surface *D. nodosus*, promptly reducing environmental contamination (Green & George, 2008). Kaler *et al.* (2010) concluded that replacing foot-paring with the use of parental antibiotics would accelerate the recovery of over a million British footrot affected lame sheep per year, with subsequent gains in production.

However, the extensive use of parenteral antibiotics has some limitations, since the maximum effect of antibiotics occurs when sheep are held in dry conditions for 24 hours after the injection, which may not be possible for most sheep flocks (Egerton *et al.*, 1968). Another disadvantage is the inability to sell sheep for human consumption until after the withdrawal period, which can last several weeks for some antibiotics (Jordan *et al.*, 1996). The overuse of antibiotics also leads to the development of drug resistance and the European commission has made limiting these medications in both human and veterinary medicine a priority (Hilerton *et al.*, 2017). Additionally, growing numbers of organic herds, in which the use of antibiotics is prohibited, has led to demand for new environmentally friendly therapies to be found (Szponder *et al.*, 2017).

Szponder *et al.* (2017) performed a study on sheep suffering from footrot and implemented an alternative therapy consisting of ozone therapy and the application of autologous platelet-rich plasma. Ozone is a strong antioxidant which promotes oxidative stress and restricts some inflammatory cell factors (Ozbay *et al.*, 2016) and is successfully used to heal many kinds of wounds (Guyen *et al.*, 2009). Platelet-rich plasma has been extensively used to promote healing in lesions since it locally introduces increased concentrations of growth factors and other bioactive molecules in injured tissues (Arnoczy *et al.*, 2011). The use of this therapy was successful in the totality of the animals and no side-effects were observed in treated sheep. As such, the local application of ozone and platelet-rich plasma may be considered an effective treatment for footrot as a replacement for the conventional use of antibiotics and disinfectants

demands to be replaced. However, this protocol is expensive and time-consuming, which probably precludes its large-scale use (Szponder *et al.*, 2017).

### **1.11 – Control**

Control programs aim to minimize disease's adverse effects in cases where complete elimination of the pathogen is not possible (Green & George, 2008). The control of footrot focuses on some major goals such as limiting the spread of the disease, decreasing the severity of clinical signs in affected animals and improving resistance to disease so that sheep can better withstand environmental challenges (Green & George, 2008). The control involves a combination of strategies such as different treatment methods, quarantine, vaccination, culling chronically infected sheep or selective breeding for improved genetic resistance (Winter, 2009). It is expected that such measures will lead to a decrease in prevalence inside the flock and reduce the severity of clinical signs in the animals that remain infected. However, it is important to note that none of the procedures used to control the disease represent a lasting approach to disease management (Raadsma & Egerton, 2013).

The development of a successful control program needs to take into consideration various factors, such as the strains of *D. nodosus* present in each region and the exact seasonality of the disease in the area where the herd is located (Frosth *et al.*, 2015). Environmental specificities can lead to adjustments in the periods in which control measures should be implemented (Raadsma & Egerton, 2013). The non-transmission period is the most effective period to implement most control strategies (Mills *et al.*, 2012), however a vaccination protocol can be successfully implemented at any time, irrespective of the flock's disease status (Dhungyel *et al.*, 2014).

Factors that increase susceptibility to footrot should be avoided. Animals should not be exposed to wet conditions or to abrasive pasture, since these conditions may damage foot integrity (Green & George, 2008).

Footbathing is an effective strategy to limit the spread of footrot within a flock, as the disinfectant can kill bacteria present on the foot surface and reducing the environmental contamination (Green & Clifton, 2017). The use of parenteral antibiotics is one of the most effective procedures to control footrot (Strobel *et al.*, 2014), though the costs associated with this treatment are not always justified in mild cases (Raadsma & Egerton, 2013). Other effective mandatory control measures are the non-acquisition of sheep from flocks of unknown footrot status and preventing animals from grazing in the same areas as neighboring flocks (Raadsma & Egerton, 2013).

## 1.12 – Eradication

Eradication programs aim to permanently eliminate all cases of footrot in a limited region. Once eradication has been achieved, it is expected that no further cases of footrot will occur, unless it is reintroduced from another source (Raadsma & Egerton, 2013). Eradication is obviously a challenging goal, but its effects are permanent and the advantages long-lasting. As the annual cost of eradicating footrot from a flock can be over \$ 10 per animal, several important factors should be taken into consideration in order to minimize financial waste before undertaking an eradication program (McPherson *et al.*, 2017).

It is important to understand the various transmission patterns occurring over the season as these determine the best period in which to implement specific preventive measures. It is also imperative that the owner of the flock is conscious that this method is costly and time-consuming. All clinical cases of footrot should be detected as soon as possible, so that operators can recognize them in the early stages of development (Raadsma & Egerton, 2013).

There are several methods of eradication. The most simple and effective is *whole flock disposal*, though owners are often reluctant to dispose of the entire flock (Mills *et al.*, 2012). *Disposal of affected animals* is another effective option, but can only be applied when prevalence is low. *Identification and treatment of affected animals* is possible, but has a much lower probability of success (Raadsma & Egerton, 2013). Mills *et al.* (2012) developed a survey of 196 flocks that eradicated virulent footrot using different methods and concluded that the *whole flock disposal* was clearly the most efficient strategy.

Cattle are a reservoir of benign footrot strains of *D. nodosus* for sheep, but there is no evidence that virulent strains of *D. nodosus* can infect feet of cattle (Raadsma & Egerton, 2013). Goats, on the other hand, can be reservoirs of virulent footrot for sheep (Ghimire *et al.*, 1999). This indicates the improbability of eradicating footrot on those farms where sheep graze in the same area as other ruminants.

All flocks to have successfully undergone an eradication program should be subjected to a regular surveillance program in following years in order to maintain footrot-free status (Raadsma & Egerton, 2013). It is important to note that an eradication program generates flocks with animals that are highly susceptible to footrot infection if the disease is reintroduced in the herd, thus new animals should be acquired exclusively in farms free from footrot and animal contact between neighboring flocks should be avoided (Green & George, 2008).

### 1.13 – Vaccination

The first vaccine against footrot in sheep was developed in 1969 (Egerton, 1970), but only in 1974 it was possible to recognize that whole cell bacterins vaccines were not capable of protecting sheep against heterologous serogroups (Egerton, 1974). Vaccines need to induce antibody titres against fimbrial antigens from each specific serogroup of *D. nodosus*, since there is no cross-protection between them (Raadsma & Egerton, 2013). This is explained by the a phenomenon of antigenic competition, in which a weak antibody production occurs against individual components if a multivalent (containing three or more antigens) vaccine is used (Hunt *et al.*, 1994). In that way, an efficient vaccine should lead to efficient antibodies production, maintaining high antibody titres for the longest period possible (Dhungyel *et al.*, 2014).

Monovalent vaccines can be quite useful if used strategically in farms or regions where only one serogroup of *D. nodosus* is present (Bennett & Hickford, 2011). The implementation of that approach was responsible for the eradication of footrot in Nepal (Egerton *et al.*, 2002) and Bhutan (Gurung *et al.*, 2006). Bivalent vaccines can also be effective, without any reduction on humoral immune response. However, multivalent vaccines are not efficient because they produce a weak and short-term antibody response (Arnoczy *et al.*, 2011). While multivalent vaccines are able to protect animals for up to 10 weeks, mono or bivalent vaccines can induce an extended immunity of 16 weeks or longer (Dhungyel *et al.*, 2014). Nevertheless, consecutive rounds of bivalent vaccinations, with an inter-vaccination interval of 90 days, can be successfully implemented in flocks affected by several serogroups of *D. nodosus* (Dhungyel & Whittington, 2010).

Vaccination against *D. nodosus* has been shown to be effective not only to prevent footrot, but to treat sheep already presenting footrot lesions (Liardet *et al.*, 1989). The therapeutic effect can range from reduction in lameness to full healing of lesions (Dhungyel *et al.*, 2008). Winter *et al.* (2015) reported an average 20% reduction in prevalence after the commencement of a vaccination program.

Currently, the antigenic variation is mainly attributed to fimbriae, so it is expected that specific (mono or bivalent) fimbrial vaccines will remain the best option until an antigen covering all serogroups is found (Dhungyel *et al.*, 2014). Thus, future research should be focused in sequencing the *D. nodosus* genome, as it could be the key factor in developing a universal cross-protective vaccine (Muzafar *et al.*, 2016).

## 1.14 – Genetic improvement

Some British ovine breeds such as Romney have proven to be more resistant to the development of severe footrot than the Merino breed (Emery *et al.*, 1984). This resistance is expressed by a quick resolution of benign lesions limited to the interdigital skin. In addition, these breeds responded more favorably to topical, parenteral and immunological therapy (Dhungyel *et al.*, 2014).

The natural resistance of sheep exposed to the same environmental conditions varies considerably, ranging from no clinical signs of infection to severe cases of footrot. The variation of disease resistance is expected to have an important genetic basis (Escayg *et al.*, 1997). The estimated value of heritability of resistance to footrot could be as high as 0,31 (Escayg *et al.*, 1997), suggesting that the use of crossbreeding with resistant animals may be very useful in producing more resilient flocks (Bennett & Hickford, 2011). This will only be possible after comparing data of genetic markers with phenotypic assessment (Bishop & Morris, 2007). Nieuwhof *et al.* (2009) estimates that the benefits (prevalence reduction) of selecting for footrot resistance can exceed the results predicted by the existing genetic models.

It would be remarkable if molecular techniques could be used to identify resistant animals, which would help breeders select for footrot resistance (Mucha *et al.*, 2015). Thanks to such techniques, it was possible to identify an association between resistance to footrot and MHC class II markers (Escayg *et al.*, 1997), probably because the ovine MHC class II plays an important role in modulating the response of sheep to footrot challenge (Escayg *et al.*, 1997). This link is the basis of a commercial gene test developed in New Zealand, which is used to select more resistant animals without the need to expose them to footrot infection (Bishop & Morris, 2007). However, it is expected that specific genetic tests need to be developed for each particular breed and population (Bennett & Hickford, 2011).

Mucha *et al.* (2015) attempted to identify molecular predictors of footrot resistance in Texel sheep using the genome-wide screening approach. This study did not identify any potential candidate genes for footrot susceptibility, suggesting that the genetic background of footrot has a polygenic determinant. However, that study was only the first step on searching any genomic regions involved in resistance to footrot, and further research should be employed.

## 1.15 – Conclusion

Ovine footrot is associated with a large economic and welfare impact, remaining an important problem nowadays, despite being intensively researched for a long period.

Eradication programs have been successfully implemented in limited regions, but it has not been possible to apply them on large-scale due to disease complexity. The diversity of *D. nodosus* strains and the environmental particularities of each region may require different control strategies. Therefore, there are several areas in which researchers may gather important information that can be useful to control the disease in the future. The knowledge of the aetiology of the disease and the development of effective management practices may be key areas to control footrot. Furthermore, the production of more resilient stock can be achieved, in a short term, by implementing strategic vaccination protocols, but the protective will not last long if that protocols are interrupted. However, the use of genetic selection programs will be the key to produce flocks with increased resilience and resistance. In Alentejo region, Portugal, it has been developed a research in white and black Merino sheep whose goal is to identify genetic markers involved in resistance to footrot in those breeds.

## **Capítulo 2 – Avaliação da capacidade de reconhecimento de lesões de peeira pelos produtores de ovinos do Alentejo**

### **2.1 – Introdução**

A claudicação dos animais constitui, atualmente, um dos maiores desafios enfrentados pelas explorações de ovinos, quer no plano estritamente sanitário quer ao nível da preservação do bem-estar animal (Best *et al.*, 2020). Pela definição etimológica do termo, a claudicação corresponde a uma alteração do curso normal da locomoção, equivalendo assim a um sinal clínico (Gelasakis *et al.*, 2019). Todavia, existem diversas lesões ou doenças, infecciosas ou não, que podem ser consideradas como responsáveis por tal sintomatologia. Dado que cada uma dessas situações envolve formas de tratamento e estratégias de controlo diferentes, torna-se crucial que os indivíduos que em contexto profissional lidam no seu quotidiano com os ovinos disponham de competência e sensibilidade para diferenciar as lesões que provocam a claudicação. Porém, apesar da relativa facilidade com que os produtores conseguem identificar a presença de lesões podais (Kaler & Green, 2008), regularmente surgem diagnósticos incorretos, sobretudo no caso de outras lesões que são erradamente atribuídas à peeira (Kaler & Green, 2006; Conington *et al.*, 2010). Algumas das confusões mais frequentes ocorrem justamente com lesões de dermatite digital contagiosa dos ovinos (DDCO), da denominada doença da linha branca ou, ainda, com o abcesso podal ou o granuloma digital.

As investigações confirmam que a peeira é uma doença altamente contagiosa, sendo mesmo considerada a principal causa de claudicação em ovinos a nível global (Raadsma & Egerton, 2013). O agente etiológico que provoca esta enfermidade é fundamentalmente a bactéria *D. nodosus*, não obstante existirem relatos de outras bactérias que também estão associadas àquela afeção (Allworth, 2014). Numa fase inicial do desenvolvimento da doença, a infeção permanece confinada ao espaço interdigital, originando uma lesão de dermatite interdigital (Winter, 2008). Posteriormente, caso certas condições ambientais estejam reunidas, as bactérias podem estender-se aos tecidos adjacentes, conseguindo, em situações mais severas, provocar a separação total entre as úngulas e as estruturas sensitivas (Bennett & Hickford, 2011).

A doença conhecida por DDCO parece corresponder a uma afeção podal com elevado grau de disseminação, sendo causada por espiroquetas pertencentes ao género *Treponema*, se bem que a patogénese da doença ainda não se encontre plenamente clarificada (Angell *et al.*, 2015). Ao invés do que se verifica nos casos de peeira, as lesões

iniciais provocadas pela DDCO localizam-se junto ao bordo coronário. Com a dinâmica temporal da lesão, a inflamação estende-se posteriormente aos tecidos contíguos, culminando nos casos mais severos com a completa separação da úngula (Sullivan *et al.*, 2015; Gelasakis *et al.*, 2019), tal como também referimos no caso da peeira.

No caso da afeção designada por doença da linha branca, também conhecida pela expressão inglesa *shelly hoof* (Reeves *et al.*, 2019), estamos perante uma imperfeição da superfície solar abaxial do estrato córneo, a qual provoca o seu descolamento nas situações mais graves (Winter & Arsenos, 2009). Se bem que o conhecimento sobre a sua etiologia não esteja inteiramente consolidado, tem sido aceite sem grande contestação que certos fatores ambientais e genéticos desempenham um papel relevante na sua origem (Gelasakis *et al.*, 2019), estando a componente infecciosa praticamente descartada (Winter & Arsenos, 2009).

O abcesso podal é outra das causas atribuídas à claudicação dos animais, sendo vulgarmente reportada em ovinos (West, 1983) e que habitualmente é reconhecida como sendo causada pelas bactérias *Actinomyces pyogenes* ou *F. necrophorum* (Winter, 2008; Gelasakis *et al.*, 2019). Estas lesões caracterizam-se pela presença de um conteúdo purulento (Winter, 2008), o qual poderá drenar pelo espaço interdigital e/ou pelo bordo coronário (Gelasakis *et al.*, 2019).

Finalmente, concluímos esta apresentação sintética das doenças usualmente associadas à claudicação em ovinos com a referência ao granuloma digital, o qual corresponde ao crescimento hiperplásico de tecido conjuntivo altamente vascularizado a partir de uma zona inicial do córion que sofreu algum tipo de ferimento (Gelasakis *et al.*, 2019). Este desenvolvimento celular descontrolado resulta de uma resposta ao corte excessivo nos tecidos sensitivos dos dígitos, situações que ocorrem com regularidade durante as atividades de podiatria (Winter, 2008).

Em suma, em função das analogias que referimos, a questão da efetiva avaliação dos diagnósticos diferenciais revela-se um fator determinante no processo de decisão sobre as subsequentes ações terapêuticas. Deste modo, o trabalho apresentado ao longo deste capítulo focou-se na avaliação da capacidade de diagnosticar corretamente lesões podais pelos produtores de ovinos do Alentejo, com particular enfoque nas lesões provocadas por peeira. É nosso propósito averiguar a real capacidade de reconhecimento de lesões de peeira por parte dos produtores, por forma a estabelecer parâmetros que permitam aferir qual o grau de confiança que podemos dispor para a interpretação dos resultados que serão apresentados e analisados nos capítulos subsequentes.

Creemos que este aspeto de validação será crucial para aferir a sustentabilidade dos dados apurados pelos *Inquéritos Epidemiológicos* (Capítulo 3), em virtude de o diagnóstico sobre a existência de doença ser feito diretamente pelos produtores,

dependendo assim da sua aptidão para diferenciar as várias doenças podais. Desta forma, o presente capítulo centrou-se na descrição da aplicação de um questionário específico, adiante designado por *Inquérito de Validação*, onde são apresentadas imagens ilustrativas de várias lesões podais de ovinos, sendo os inquiridos desafiados a avaliar quais dessas lesões correspondem efetivamente a algum dos estágios evolutivos de peeira.

## **2.2 – Metodologia**

### **2.2.1 – Elaboração do *Inquérito de Validação***

Como referido, o propósito principal do desenho e aplicação do *Inquérito de Validação* prendeu-se com a recolha de informação que possibilite avaliar a capacidade de diagnóstico de lesões de peeira ovina pelos produtores da região Alentejo. A metodologia desenvolvida baseou-se numa adaptação própria dos trabalhos pioneiros efetuados por Kaler & Green (2006).

O inquérito que suporta a recolha de informação obedece a uma estrutura bastante simples para facilitar a sua adequada perceção pelos inquiridos (Anexo 1), sendo composto por uma única página redigida em língua portuguesa. A primeira parte deste questionário teve como finalidade identificar a unidade de exploração (marca oficial e detentor da mesma) e indagar sobre a eventual presença de animais com lesões de peeira no efetivo. A segunda parte constava da apresentação de algumas imagens relativas a várias doenças podais em ovinos, sobre as quais os inquiridos responderiam a duas questões:

1. Relativamente às imagens (e respetiva legenda explicativa) em anexo, e de acordo com a sua experiência, indique qual (ou quais) das seguintes lesões representa(m) casos clínicos de peeira ovina (Identificar com **X** a(s) lesões que considera serem casos de peeira).
2. Relativamente às imagens (e respetiva legenda explicativa) em anexo, indique qual (ou quais) das seguintes lesões podais já observou em ovinos na sua exploração (Identificar com **X** a(s) lesões que já observou).

Ambas as questões eram acompanhadas por um quadro que continha oito opções de resposta, sendo que os inquiridos tinham a possibilidade de selecionar as respostas que entendessem ser corretas, podendo no limite assinalá-las todas, ou não indicar qualquer opção.

O referido inquérito fazia-se acompanhar por uma compilação de nove fotografias (Anexo 2), impressas a cores, de extremidades distais de membros de ovinos. Uma das imagens representava a estrutura fisiológica sem qualquer tipo de alteração (imagem 0)

e as restantes oito retratavam lesões características que afetam os dígitos desta espécie (imagens de 1 a 8). Cada uma destas imagens era acompanhada por uma legenda explicativa que sinalizava as alterações para as quais os produtores deviam prestar particular atenção, aquando da identificação do tipo de lesão podal em questão.

O conjunto das fotografias contendo lesões podais expunha imagens de DDCO, abcesso podal, granuloma digital, doença da linha branca (*shelly hoof*) e imagens representativas dos quatro graus evolutivos de lesões de peeira (graus 1-4, de acordo com a classificação definida por Egerton & Roberts (1971)). Na compilação fotográfica apresentada aos inquiridos, surgiam intercaladas as imagens de peeira com as referentes a outras afeções de natureza podal, não seguindo qualquer padrão lógico que induzisse uma resposta particular por parte dos produtores.

### 2.2.2 – Determinação da dimensão da amostra

A determinação da dimensão necessária para a representatividade desta amostra foi realizada com recurso ao aplicativo *Sample Size Calculator*<sup>1</sup>. Utilizou-se como estimativa uma prevalência da doença de 50% para a região, admitindo-se ainda que seria possível recolher 500 *Inquéritos Epidemiológicos*. A margem de erro definida para esta análise foi de 10%, tendo-se ainda admitido um nível de confiança de 90%. O conjunto destes critérios resultou no cálculo de uma amostra mínima de 61 *Inquéritos de Validação*. Assim, a referida amostra permitir-nos-á afirmar que existe 90% de probabilidade de que a real prevalência de cada afeção avaliada esteja compreendida no intervalo  $[\mu-10; \mu+10]^2$ . O cálculo da prevalência estimada apenas foi realizado para as afeções podais que não correspondem a lesões de peeira<sup>3</sup>.

### 2.2.3 – Aplicação do *Inquérito de Validação*

Na fase inicial do processo foi aplicado um teste piloto em cinco explorações pecuárias, tendo sido posteriormente implementadas ligeiras alterações tipográficas até consolidar a versão final do inquérito, de acordo com sugestões que nos foram sendo transmitidas. Este inquérito foi direcionado para proprietários de explorações de ovinos sediadas no Alentejo. O processo de seleção dos produtores decorreu de modo aleatório, tendo a recolha de dados decorrido na forma de entrevista presencial. Esta configuração foi adotada em virtude de assegurar uma maior fiabilidade, associada ao contacto direto com os inquiridos (Shelly & Rosenblatt, 2011). O período temporal de aplicação destes *Inquéritos de Validação* decorreu entre setembro e dezembro de 2016.

---

<sup>1</sup> Acesso em <https://www.calculator.net/sample-size-calculator>

<sup>2</sup> Considerando o total de explorações que serão avaliadas nos *Inquéritos Epidemiológicos*.

<sup>3</sup> Em concreto, DDCO, granuloma digital, abcesso podal, doença da linha branca e dermatite interdigital.

Refira-se que todos os produtores que responderam a estes questionários também preencheram o *Inquérito Epidemiológico*.

#### 2.2.4 – Análise de dados

Os dados recolhidos foram registados e processados com recurso ao programa informático de análise de dados *IBM SPSS Statistics (version 26)*. As respetivas estatísticas descritivas foram calculadas, tendo a análise univariada sido efetuada com recurso a uma análise de regressão simples. A comparação entre proporções foi feita com base no teste *Qui-quadrado*, tendo ainda sido calculados para alguns parâmetros os valores de *Odds-ratio* (OR) e respetivos intervalos de confiança (IC). O nível de significância considerado para todas as análises foi de 0,05.

### 2.3 – Resultados

#### 2.3.1 – Caracterização da amostra

O número total de questionários validados foi de 61, sendo que em todos se obteve resposta às três questões colocadas. Nesta amostra, 22 dos produtores inquiridos afirmam ter casos de peeira nos seus efetivos, o que corresponde a cerca de 36% do total da amostra.

#### 2.3.2 – Reconhecimento de lesões de peeira

Relativamente às imagens apresentadas aos inquiridos, entre as que representam um dos *scores* lesionais de peeira (imagens 1, 2, 5 e 7 do Anexo 2), a proporção de lesões corretamente identificadas variou entre 95,1% (*score* 1) e 100% (*score* 4), conforme exposto na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Respostas corretas para as imagens relativas aos quatro *scores* lesionais de peeira (n=61)

<b>Score lesional de peeira (0-4)</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>Nº da imagem</b>	1	7	5	2
<b>Nº respostas corretas</b>	58	59	59	61
<b>% respostas corretas</b>	95,1	96,7	96,7	100

No caso das restantes lesões podais, que não são atribuídas à ação da bactéria *D. nodosus* (imagens 3, 4, 6 e 8 do Anexo 2), a proporção respondida corretamente dispersou-se entre 88,5% (DDCO) e 96,7% (doença da linha branca), tal como pode ser observado na Tabela 2.2. Recordamos que para estas respostas serem consideradas

corretas seria necessário que os produtores não as tivessem assinalado como imagens características da peeira.

Tabela 2.2 – Respostas corretas para as imagens de DDCO, granuloma digital, abscesso podal e doença da linha branca (n=61)

Lesão podal	DDCO	Granuloma digital	Abscesso podal	Doença da linha branca
Nº da imagem	3	4	6	8
Nº respostas corretas	54	57	55	59
% respostas corretas	88,5	93,4	90,2	96,7

A probabilidade de um indivíduo responder de forma completamente arbitrária e ainda assim o fazer acertadamente face às oito hipóteses colocadas<sup>4</sup> corresponde a 0,39%, algo que seria bastante improvável de ocorrer se as respostas fossem aleatórias. A proporção de produtores que respondeu corretamente à totalidade das questões (0 erros) foi de 80,3%. A probabilidade de um produtor de ovinos ter falhado uma, duas ou, no mínimo, três respostas correspondeu a 9,8%, 3,3% e 6,5%, respetivamente, como podemos constatar pela observação da Tabela 2.3.

Tabela 2.3 – Número de respostas incorretas no diagnóstico de peeira (n=61)

Nº de Erros	0	1	2	3	4	5	6
Nº de produtores	49	6	2	2	1	0	1
% de produtores	80,3	9,8	3,3	3,3	1,6	0	1,6

Ao analisar conjuntamente a capacidade de reconhecimento de lesões de peeira e as respostas à questão *O efetivo ovino tem peeira?*, constatamos que a proporção de produtores que respondeu corretamente à totalidade das questões foi superior no grupo que afirma não ter peeira (82,1%), quando comparado com a registada nas explorações que têm a doença (77,3%). Em conformidade com as recomendações de Campbell (2007), a comparação entre as duas proporções foi efetuada através da implementação do teste *Qui-quadrado*, verificando-se que a diferença entre os dois grupos não é estatisticamente significativa ( $\chi^2=0,202$ ; valor p = 0,65).

Ao observarmos o número de imagens corretamente assinaladas, registamos que nas explorações em que existe a doença, sempre que não houve acerto total<sup>5</sup>, o número de erros limitou-se sempre a um único, tal como podemos observar no Gráfico 2.1. No caso das explorações em que não existem casos de peeira, sete produtores não acertaram no

<sup>4</sup> Assinalar as quatro imagens com lesões de peeira e simultaneamente não marcar nenhuma das quatro lesões podais restantes

<sup>5</sup> Cinco respostas, respeitantes a 22,7% dos inquiridos

diagnóstico (17,9%), sendo que em seis deles (15,4%) ocorreu uma identificação incorreta em pelo menos duas imagens (Gráfico 2.2).

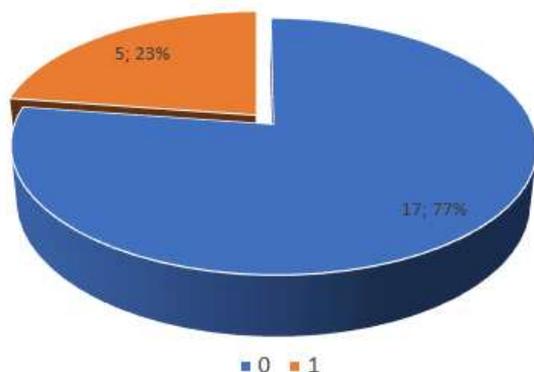


Gráfico 2.1 - Distribuição dos erros de diagnóstico nas explorações com peira (n=22; %)

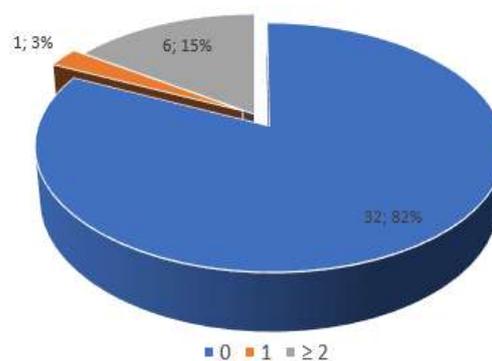


Gráfico 2.2 - Distribuição dos erros de diagnóstico nas explorações sem peira (n=39; %)

### 2.3.3 – Tipologia das lesões existentes nas explorações

No que respeita à análise da distribuição das lesões de peira foram considerados dois subgrupos de acordo com dois critérios distintos. No primeiro incluímos o conjunto de explorações que responderam *Sim* na questão *O efetivo ovino tem peira?* (Critério 1; n=22), enquanto o segundo integra apenas as explorações que, concomitantemente, tinham peira na exploração e em que houve um acerto total no diagnóstico de lesões da doença (Critério 2; n=17). A Tabela 2.4 apresenta as percentagens de explorações em que foram identificados animais com cada um dos quatro *scores* lesionais, segundo os dois critérios definidos.

Tabela 2.4 – Explorações com peira em que foram identificados os diferentes *scores* lesionais, segundo os dois critérios

Score lesional	Critério 1 (n=22)		Critério 2 (n=17)	
	Nº	%	Nº	%
1	21	95,5	17	100
2	11	50	8	47,1
3	11	50	8	47,1
4	17	77,3	14	82,4

Como podemos constatar pela observação do Gráfico 2.3, as tendências foram bastante convergentes, pois não se deteta uma variação significativa entre os dois critérios.

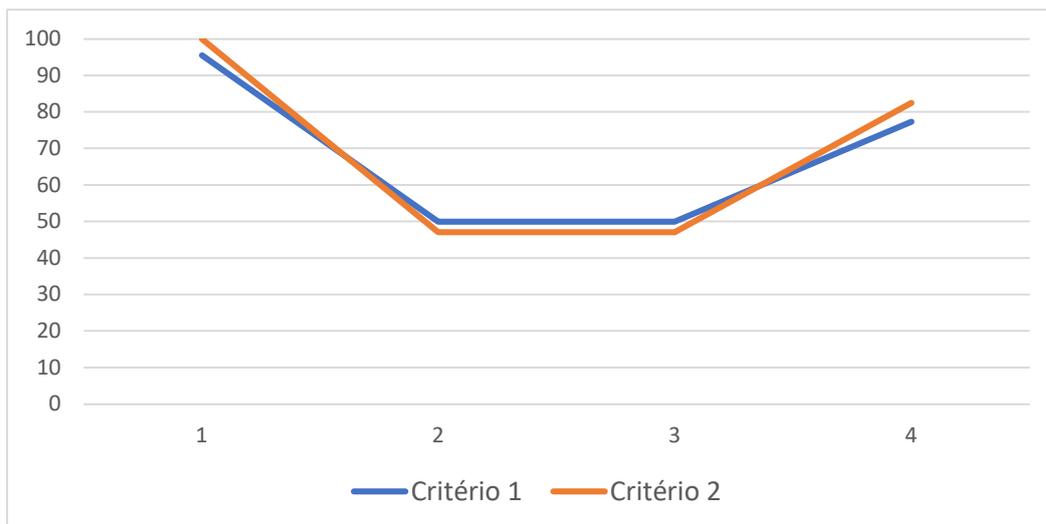


Gráfico 2.3 - Percentagem de explorações com peeira em que foram identificados os diferentes scores lesionais, segundo os dois critérios

Antes de analisarmos quais as lesões mais frequentemente registadas nas explorações, tivemos oportunidade de procurar despistar possíveis inconsistências que indiciassem alguma falta de rigor na resposta a este questionário. Assim, foram definidas duas condições, que caso fossem verificadas poderiam levar à rejeição dessas respostas nas análises seguintes:

1. O produtor afirmou ter casos de peeira, contudo não observou qualquer lesão similar às que tinha assinalado como correspondentes a casos de peeira;
2. O produtor declarou não ter casos de peeira, mas referiu ter visto na sua exploração lesões idênticas às que sinalizou como causadas por peeira.

Pela aplicação das referidas condições aos inquéritos obtidos, verificámos que existiam 14 questionários que se enquadravam com alguma delas, facto que nos levou a ponderar a sua eventual exclusão do lote de respostas analisadas.

Por um lado, em 10 questionários observámos um padrão de resposta idêntico, tendo todas revelado a não existência de casos de peeira nos rebanhos, embora os produtores tenham respondido que observaram lesões idênticas às de *score* 1. Esta tendência não é surpreendente, uma vez que, apesar de esta imagem corresponder ao primeiro nível de severidade das lesões de peeira, a dermatite interdigital observada nesta fase corresponde a uma lesão não patognomónica de peeira, sendo frequentemente observada em outras doenças distintas (Abbott & Lewis, 2005). Consequentemente, decidimos considerar estas 10 respostas como válidas.

Em relação aos restantes quatro inquéritos (6,6% do total) decidimos não considerar as respostas porque o padrão de resposta não revelou consistência. Assim, o número de

inquéritos considerado para o cálculo da frequência das lesões podais observadas pelos produtores foi de 57.

Na Tabela 2.5 podemos observar as prevalências estimadas para as outras lesões podais diferentes das causadas pelo agente *D. nodosus*. Para além das quatro lesões já referidas (DDCO, abcesso podal, granuloma digital e doença da linha branca) resolvemos incluir também a dermatite interdigital (imagem 1 do Anexo 2), por tratar-se de uma lesão inespecífica.

Tabela 2.5 – Explorações em que foram observados animais com dermatite interdigital, DDCO, granuloma digital, abcesso podal e doença da linha branca (n=57)

Lesão podal	Imagem	Nº explorações	% explorações	IC 90%
<b>Dermatite interdigital</b>	1	32	56,1	[46,1; 66,1]
<b>DDCO</b>	3	6	10,5	[0,5; 20,5]
<b>Granuloma digital</b>	4	14	24,6	[14,6; 34,6]
<b>Abcesso podal</b>	6	29	50,9	[40,9; 60,9]
<b>Doença da linha branca</b>	8	19	33,3	[23,3; 43,3]

### 2.3.4 – Correlação entre a presença de peeira e outras lesões podais

Procedemos à análise univariada entre a presença de lesões de peeira e a observação das restantes quatro lesões podais, sendo que apenas retivemos a existência de correlação positiva e estatisticamente significativa com a imagem de DDCO (Tabela 2.6). Deste modo, o resultado obtido indicia que as explorações em que foram identificadas lesões idênticas à da imagem número 3 da compilação fotográfica presente no Anexo 2 (DDCO) têm uma probabilidade quase 34 vezes superior de possuir a doença no seu efetivo pecuário, quando comparadas com as explorações em que não foram observadas tais lesões.

Tabela 2.6 – Análise univariada entre a ocorrência de peeira e restantes lesões podais nas explorações

Variável (n)		Nº explorações com peeira	% explorações com peeira	OR	IC 95 %	Valor p
<b>DDCO</b>	Não (51)	14	27,5			
	Sim (6)	6	100	33,62	[1,78; 635,75]	< 0,05
<b>Granuloma digital</b>	Não (43)	13	30,2			
	Sim (14)	7	50	2,31	[0,67; 7,92]	0,18
<b>Abcesso podal</b>	Não (28)	7	25			
	Sim (29)	13	44,8	2,44	[0,79; 7,51]	0,12
<b>Doença da linha branca</b>	Não (38)	14	36,8			
	Sim (19)	6	31,6	0,79	[0,25; 2,55]	0,7

## 2.4 – Discussão

O objetivo primordial da investigação descrita neste capítulo foi reconhecer a capacidade de diagnóstico de lesões de peira pelos produtores de ovinos. A necessidade de realizar esta aferição prende-se com o facto de as conclusões que serão apresentadas e discutidas nos capítulos seguintes partirem do pressuposto de que os produtores de ovinos que responderam aos *Inquéritos Epidemiológicos* possuíam a aptidão necessária para reconhecer as lesões exibidas pelos animais afetados por peira. Deste modo, podemos verificar, com base em dados objetivos, qual o grau de validade efetiva das conclusões que serão extraídas em capítulos posteriores.

Num cenário ideal, a validação desses questionários poderia ter sido feita presencialmente em cada uma das explorações avaliadas. Todavia, tal possibilidade não foi equacionada, devido ao elevado número de explorações inseridas nessa amostra e às inerentes restrições económicas e temporais que daí decorriam. Deste modo, a aplicação desse tipo de metodologia ficou inviabilizado.

Exposta esta situação, considerámos que o cenário alternativo mais adequado seria o desenvolvimento e a aplicação dos *Inquéritos de Validação*. Assim estes questionários permitiram aferir o grau de competência dos produtores para identificarem lesões de peira nos diferentes patamares de severidade. Este processo foi concretizado através do recurso a um conjunto de fotografias, tal como tinha sido aplicado nos trabalhos de Kaler & Green (2006). A dimensão da amostra obtida para estes questionários (n=61) foi considerada estatisticamente adequada face ao propósito para o qual foram concebidos, de acordo com os parâmetros nível de confiança e margem de erro definidos.

A opção escolhida para aferir a capacidade de diagnóstico dos agentes que lidam diretamente com os animais foi a apresentação de fotografias elucidativas de algumas das lesões podais mais frequentemente registadas na espécie ovina. De acordo com os trabalhos de Kaler & Green (2008), o uso de fotografias e imagens exemplificativas é uma técnica de diagnóstico válida, sempre que não seja possível identificar as afeções podais nos próprios animais. Para além disso, a utilização de imagens coloridas torna os questionários mais apelativos e aproximados das situações reais, transmitindo ao inquirido maior motivação para colaborar com este tipo de investigações (Kaplowitz & Lupi, 2004).

A proporção global de produtores na região Alentejo que acertou na identificação da totalidade de lesões relativas aos diversos graus de severidade da doença em estudo atingiu um valor moderadamente elevado (80,3%) e encorajador. A interpretação deste resultado torna-se mesmo algo surpreendente se for estabelecida uma comparação direta com os indícios obtidos em pesquisas similares em Inglaterra, tais como aquela que foi desenvolvida por Kaler & Green (2008). Apesar da elevada capacidade de

identificação de alterações patológicas nas úngulas dos animais, os referidos trabalhos revelaram que frequentemente não foi utilizada a terminologia correta. Os produtores inquiridos demonstraram mesmo uma tendência generalizada para designar qualquer lesão podal como sendo um processo derivado da peeira (Kaler & Green, 2006; Kaler & Green, 2008).

Tanto quanto é do nosso conhecimento, não existem quaisquer relatos de casos de DDCO em Portugal, sendo esta doença exclusivamente reconhecida no Reino Unido (Gelasakis *et al.*, 2019). Esta parece mesmo constituir a razão maior para esta diferença verificada entre os resultados deste estudo e aqueles publicados no Reino Unido (Kaler & Green, 2008), uma vez que a peeira e a DDCO correspondem às duas principais causas de claudicação em ovinos (Duncan *et al.*, 2012), estando a primeira presente em mais de 95% dos rebanhos (Winter *et al.*, 2015), enquanto a segunda supera os 50% (Angell *et al.*, 2014), tornando inevitável que ambas as afeções se sobreponham em vários efetivos.

A peeira já é amplamente conhecida há mais de dois séculos (Beverdige, 1941), enquanto a DDCO é uma doença que foi identificada recentemente, tendo o primeiro relato ocorrido há pouco mais de duas décadas (Duncan *et al.*, 2012), pelo que, eventualmente, muitos casos de DDCO poderão ter sido incorretamente classificados como resultantes da ação de *D. nodosus*. Desta forma, é natural e até compreensível que haja confusão na diferenciação entre as duas entidades clínicas pelos produtores britânicos, nomeadamente se tivermos em conta que correspondem às principais causas de claudicação em ovinos e que nas fases mais severas de ambas as doenças ocorre a separação do estrato córneo com destacamento total do casco (Raadsma & Egerton, 2013; Gelasakis *et al.*, 2019).

Nesta perspetiva, e uma vez que no Alentejo não parece existir esta eventual confusão, consideramos plausível que a taxa de acerto por parte destes produtores seja superior. Todavia, uma percentagem não negligenciável de produtores (10,5%) refere já ter observado lesões de DDCO na sua exploração, pelo que não deverá ser subvalorizada esta situação, a qual poderá ser objeto de pesquisa futura.

Se compararmos as taxas de acerto no diagnóstico das explorações que têm ou não a doença, vemos que a taxa de acerto total é maior naquelas que não têm a doença (82,1% face a 77,3%), mas a diferença registada não evidenciou significância estatística (valor  $p > 0,05$ ). Nos casos em que foi referido existir peeira, todos os produtores que não acertaram totalmente nas repostas ao inquérito (22,7%) erraram exclusivamente uma única opção, considerando-se por isso um erro de diagnóstico pouco severo. No caso das explorações em que não há casos de peeira, não obstante os erros verificados terem sido inferiores (17,9%), registou-se uma proporção expressiva de sujeitos que se equivocaram no mínimo em duas respostas (15,4%), considerando-se já como um erro grosseiro. Desta forma, estes resultados apontam para a tendência de que os

produtores que contactam com a doença estão mais familiarizados com o aspeto típico das lesões de peeira, sendo por isso pouco provável que ocorram graves erros no respetivo diagnóstico. Porém, cremos ser necessário reforçar a ideia de que esta é apenas uma tendência, que precisaria de ser certificada com uma amostragem mais expressiva.

Ao considerarmos apenas os produtores que acertaram totalmente no diagnóstico e que possuem a doença no seu efetivo pecuário, verificamos que os graus lesionais mais identificados correspondem aos extremos 1 (100%) e 4 (82,4%). No caso do *score* 1 não surpreende que todos os produtores já tenham observado este tipo de lesões, uma vez que se trata de uma lesão com reduzida especificidade, sendo que a imagem observada é idêntica tanto nas fases iniciais de peeira virulenta, como nos casos de peeira benigna ou de dermatite interdigital ovina (*scald*), conforme reconhecem Abbott & Lewis (2005). Na realidade, mesmo no caso de efetivos sem sinais de peeira, é perfeitamente possível a observação de lesões idênticas, uma vez que a dermatite interdigital ovina é causada pela bactéria *F. necrophorum*, que é um agente oportunista que faz parte da microflora normal que se encontra recorrentemente nas úngulas dos ovinos (Atia *et al.*, 2017).

No caso da lesão com classificação de severidade mais elevada, a proporção também é significativa, o que se pode revelar um dado inquietante, já que tal significa que nesses rebanhos já foram observados animais que manifestam o patamar mais grave da doença. Nesses casos ocorre a separação da úngula, ficando os tecidos subjacentes sujeitos a necrose e putrefação, podendo a locomoção do animal ficar condicionada de forma irremediável (Raadsma & Egerton, 2013).

Dado que os produtores não foram questionados sobre a proporção de animais que apresentaram este tipo de lesões, não podemos fazer especulações sobre as três formas de expressão clínica da doença nos efetivos, correspondendo a casos de peeira benigna, intermédia ou virulenta (Stewart *et al.*, 1986; Dhungyel *et al.*, 2014). Este poderá ser um tópico merecedor de investigação futura, uma vez que, apesar de em todas as formas clínicas de peeira poderem aparecer animais com graus de severidade mais elevados, é muito diferente estarmos perante uma situação de peeira benigna, onde menos de 1% dos animais atinge lesões de grau 4, ou de casos de peeira virulenta, em que essa proporção supera os 10% (Raadsma & Egerton, 2013).

No caso das categorias intermédias 2 e 3, as proporções registadas foram equivalentes (47,1%), valor esse que é claramente menor que o registado nas outras categorias de lesões. Tendo em conta que os *scores* lesionais seguem um certo padrão de evolução, não é expectável que os animais apresentem a lesão mais severa sem que tenham passado previamente pelos graus 2 e 3. Assim, cremos que alguns produtores não tenham estado atentos à dinâmica evolutiva das lesões apresentadas, sendo que provavelmente só se deparam com o problema quando os animais exibem situações quase irreversíveis. Outra possível justificação deve-se ao facto de muitos produtores

aplicarem antibiótico por via tópica (*spray*) nas lesões<sup>6</sup>. Quando tal situação acontece, a zona da lesão fica colorida durante um longo período, o que torna bastante difícil observar com detalhe a evolução patológica.

Apesar de não ser o objetivo principal desta parte do estudo, os dados recolhidos também permitiram estimar a prevalência de outras lesões podais, que não aquelas diretamente relacionadas com peira. Apesar de muitos trabalhadores não terem a capacidade de nomear corretamente as afeções podais, existe uma generalizada aptidão para identificar essas lesões, quer *in vivo*, quer através da observação de fotografias coloridas (Kaler & Green, 2008). Deste modo, para determinar a frequência relativa atribuída a cada lesão nos rebanhos de ovinos do Alentejo, optámos por considerar todas as respostas aos inquéritos, mesmo aquelas em que houve uma falha no diagnóstico de lesões de peira.

O abcesso podal foi a lesão podal mais frequentemente observada, tendo sido assinalada por sensivelmente metade dos inquiridos, sendo a doença da linha branca a segunda mais prevalente, tendo sido registada em um terço das explorações. Existem vários cenários que podem motivar esta situação, mas um dos mais plausíveis é o que sustenta que ambas as afeções podem ser inicialmente causadas por traumatismo na zona da unha, o que pode levar a um defeito no estrato córneo que venha a ser produzido pelo córion. Nesse local, a linha branca ficará inevitavelmente comprometida, ficando sensível a que qualquer corpo estranho, tal como uma simples pedra, se aloje no interior da linha branca (Winter, 2009). Caso ocorra então a penetração do córion, facilmente pode suceder a colonização bacteriana, podendo originar um abcesso.

Apesar de a doença da linha branca e o abcesso digital não terem a sua etiologia totalmente esclarecida, parece consensual que as carências nutricionais e as condições do solo desempenhem um papel determinante no desenvolvimento de ambas as afeções (Gelasakis *et al.*, 2019).

O granuloma digital foi identificado por cerca de 25% dos produtores, o que apesar de não corresponder a um valor tão elevado como nas lesões anteriores, não deixa de ser preocupante, uma vez que esta patologia surge como consequência de uma deficiente utilização da correção podal, em que geralmente ocorre um corte excessivo (Winter, 2008).

Tal como já referido, 10,5% dos respondentes referem ter observado lesões de DDCO no seu efetivo, ainda que não tenhamos conhecimento da existência de relatos desta afeção fora do Reino Unido. Para averiguar esta possibilidade seria deveras pertinente a realização de um estudo com o intuito de determinar se efetivamente existem casos clínicos de DDCO no Alentejo. Se a doença estiver efetivamente presente em alguns

---

<sup>6</sup> Na realidade, os resultados dos *Inquéritos de Validação* revelaram que, nos efetivos com peira, 85% dos produtores admitem utilizar essa opção terapêutica

efetivos, seria certamente relevante conhecer qual a taxa de prevalência que lhe corresponde e avaliar os fatores de risco que poderão estar subjacentes. Tal avaliação tornar-se-ia ainda mais significativa pois podemos não estar em presença de casos esporádicos e recordamos que a imagem relativa à DDCO foi a única em que foi identificada uma correlação positiva com a ocorrência de peeira no efetivo. Caso se confirmasse que a DDCO poderia constituir um fator de risco para a peeira ovina no Alentejo, estaríamos perante uma situação similar àquela que foi detetada no Reino Unido, tal como demonstraram os trabalhos de Angell *et al.* (2014).

No caso das explorações em que foi reconhecida a existência de animais com granuloma digital e abcesso podal, apesar de não ter sido registada correlação estatisticamente significativa com a verificação de casos de peeira, acreditamos que ambos poderiam eventualmente constituir-se como potenciais fatores de risco. Em ambos os casos verificámos que as percentagens de explorações com peeira foram claramente superiores, sempre que qualquer uma das duas lesões tivesse sido identificada, sendo que os valores de OR obtidos superaram o valor 2 (apesar de o valor de  $\alpha$  não ser inferior a 5%). Desta forma, ficamos com a perceção de que para uma amostragem mais alargada poderíamos obter conclusões algo diferentes. Esta conclusão não seria inesperada, já que ambas as lesões permitiriam a criação de uma porta de entrada no estrato córneo, o que facilitaria a colonização das bactérias envolvidas na patogénese da peeira (Angell *et al.*, 2018).

## 2.5 – Conclusão

Podemos então concluir que a capacidade revelada pelos produtores pecuários do Alentejo para diagnosticar lesões de peeira é elevada, especialmente se fizermos uma comparação direta com os dados publicados em estudos realizados em outros contextos geográficos. Desta forma, as conclusões obtidas conferem-nos alguma segurança de que as análises efetuadas posteriormente serão válidas.

Quanto à identificação de outras lesões podais, como são os casos do abcesso digital, da doença da linha branca ou do granuloma digital, registamos que foram observadas pelos produtores alentejanos em dimensões assinaláveis, seguindo a tendência expressa em outras localizações geográficas. Porém, estudos com uma maior amostragem e mais específicos devem ser implementados no sentido de confirmar esta tendência. No caso da DDCO em concreto torna-se mesmo imperativo realizar uma análise no terreno, a fim de descartar ou confirmar a indicação que foi dada por cerca de 10% dos inquiridos, os quais reconheceram já ter observado esse tipo de lesões no seu efetivo pecuário. Caso essa tendência se confirmasse, tornar-se-ia no primeiro caso reportado de DDCO no nosso país, exigindo medidas de controlo adequadas.

De qualquer modo, consideramos muito relevante que se aposte na formação junto dos produtores pecuários, não só no sentido de os capacitar para uma melhor identificação das diferentes lesões podais, mas também proporcionando-lhes conhecimento técnico sobre as formas mais adequadas de tratamento e, naturalmente, de prevenção destas doenças causadoras de claudicação. Se o pressuposto inicial de que os produtores dispõem de competência e autonomia para, por si próprios, diagnosticar corretamente as lesões de peira não for garantido, estes indivíduos não poderão dar o melhor seguimento à especificidade de cada caso clínico, uma vez que cada uma das doenças envolve medidas profiláticas e terapêuticas próprias.

## **Capítulo 3 – Identificação de fatores de risco para a ocorrência de peeira em explorações de ovinos no Alentejo**

### **3.1 – Introdução**

A peeira é uma doença altamente contagiosa que corresponde à principal causa de claudicação em ovinos (Bennett & Hickford, 2011). Os primeiros registos desta doença remontam ao ano de 1810 no Reino Unido (Graham & Egerton, 1968), embora mais recentemente já tenha sido reportada em numerosos países, tornando-se um elemento relevante, em especial em regiões onde a produção de ovinos desempenha um papel importante nas respetivas economias (Raadsma & Egerton, 2013). Para além dos efeitos diretos que a doença produz do ponto de vista do bem-estar animal, é também uma das doenças da espécie ovina que maior impacto provoca na sustentabilidade económica das explorações pecuárias afetadas (Nieuwhof & Bishop, 2005). No plano clínico, a ocorrência de doença pressupõe que haja uma prévia colonização do espaço interdigital por determinadas bactérias, se bem que o papel de verdadeiro agente etiológico esteja restringido à bactéria *D. nodosus* (Allworth, 2014).

A sintomatologia causada por peeira pode ser muito distinta, variando entre lesões de dermatite interdigital nas situações menos severas, até situações extremas que podem motivar a completa separação da úngula, conforme Bennett & Hickford (2011) reconhecem. A expressão clínica da doença depende de forma íntima de três fatores fulcrais como sejam as condições ambientais, a capacidade de resistência do hospedeiro e a virulência do agente etiológico da peeira (Green & George, 2008; Raadsma & Egerton, 2013). A efetiva interação verificada entre estes fatores será então um elemento determinante para a existência de potenciais fatores de risco na ocorrência de casos de peeira.

No que concerne aos aspetos ambientais, a temperatura atmosférica e a pluviosidade assumem-se como os fatores mais relevantes para a ocorrência de casos clínicos de peeira. No que respeita à temperatura ambiente, as pesquisas têm reconhecido que quando estas atingem valores inferiores a 10°C há uma redução da capacidade de propagação da doença, enquanto os períodos mais chuvosos contribuem para uma superior disseminação de *D. nodosus* entre animais (Abbott & Lewis, 2005; Raadsma & Egerton, 2013). O tempo húmido aumenta a suscetibilidade do hospedeiro à doença, induzindo alterações físicas nas úngulas, como é o caso da dermatite interdigital, mas também modificando a flora microbiana existente, o que facilita a ação do agente etiológico (Bennett & Hickford, 2011).

Naturalmente que a interação dos aspetos ambientais com as categorias de solo predominantes nas explorações pecuárias gera contextos reais, que podem ser mais ou menos propícios ao aparecimento e à progressão das lesões. Deste modo, tem constituído uma preocupação dos investigadores o estudo destas interações, sendo largamente reconhecido que as tipologias do solo desempenham um papel fulcral na patogénese da doença. Em concreto, solos com maior teor argiloso caracterizam-se por uma reduzida capacidade de drenagem, o que contribui para que as áreas de pastagem se encontrem recorrentemente alagadas durante os períodos de maior precipitação, propiciando a disseminação da doença (Muzafar *et al.*, 2016). O facto de os ovinos pisotearem continuamente um piso enlameado leva à maceração persistente do estrato córneo das úngulas, criando uma possível via de penetração para as bactérias (Atia *et al.*, 2017). No caso das pastagens melhoradas ou das áreas que recorrem ao regadio, a cobertura vegetal apresenta, usualmente, uma maior densidade, proporcionando uma maior capacidade de retenção da humidade, o que também poderá constituir um fator de risco para esta afeição podal (Angell *et al.*, 2018). Por outro lado, as pastagens com restolho grosseiro ou a existência de solos pedregosos podem induzir o aparecimento de ferimentos no espaço interdígital, o que também favorece a ocorrência de casos de peeira por criar uma possível porta de entrada (Angell *et al.*, 2018).

Outro dos fatores de risco para a ocorrência desta doença é a elevada densidade populacional, uma vez que os animais estarão potencialmente expostos a um ambiente mais contaminado, sendo por isso mais provável o seu contacto com animais infetados e, logo, com as bactérias envolvidas na patogénese da doença (Green & George, 2008). A situação de maior vulnerabilidade será o regime de estabulação, já que nesta situação os animais estarão transitoriamente expostos a um superior encabeçamento. Nestes casos, associados por vezes a uma reduzida higienização das camas, tenderá a desenvolver-se um microambiente bastante quente e húmido, o qual favorece as características de *D. nodosus* (Green & George, 2008).

No que respeita à dimensão das explorações pecuárias, tem sido reconhecido que aquelas que possuem um efetivo animal superior apresentam um maior risco, situação que se deve, presumivelmente, ao facto de existir uma dificuldade acrescida no processo de identificação, e do conseqüente tratamento, dos animais que exibam os indícios de claudicação. Esta situação prolongará a possibilidade de excreção de agente etiológico para o meio ambiente, propiciando a infeção de outros ovinos (Angell *et al.*, 2018).

Relativamente à resistência do próprio hospedeiro, tem sido verificada pelos estudos realizados que haverá uma influência diferente nas distintas espécies ovinas. Assim, por exemplo, foi registada uma maior predisposição para a doença nos ovinos de raça merina, enquanto os animais de raça *suffolk* ou *romney* se revelaram menos vulneráveis e, portanto, mais resistentes à afeição causada por *D. nodosus* (Emery *et al.*, 1984).

Focando agora a atenção nas ações profiláticas e terapêuticas prosseguidas, tem sido demonstrado que algumas das práticas abundantemente utilizadas ao longo das últimas décadas no combate à peeira terço, ao contrário do inicialmente previsto, um efeito indesejável, uma vez que estão de facto associadas a maiores índices de prevalência e incidência da doença (Green *et al.*, 2007b).

Duas das principais opções que se enquadram naquelas terapias são o corte corretivo de úngulas e a utilização do pedilúvio, os quais, apesar dos esforços envolvidos por parte da comunidade científica, têm sido difíceis de abolir das práticas correntes dos produtores de ovinos (Green & Clifton, 2017). No caso da podiatria, recomenda-se que esta prática seja evitada, pois frequentemente a técnica não é devidamente implementada, o que propiciará a ocorrência de uma lesão na úngula, facilitando a inerente penetração bacteriana (Kaler *et al.*, 2010; Winter *et al.*, 2015). No que respeita ao pedilúvio, não obstante poderem resultar potenciais efeitos benéficos da sua utilização, existe uma série de condições que necessitam ser devidamente asseguradas. Contudo, a maioria dessas medidas não pode ser facilmente implementada em muitas explorações comerciais de ovinos devido à desadequação das infraestruturas (Winter *et al.*, 2015).

A utilização da antibioterapia, quer aplicada por via tópica ou sistémica, constitui uma das opções terapêuticas mais eficazes no controlo da peeira (Winter & Green, 2017). Tal deve-se em parte ao facto de, até à data, existirem poucas resistências antibacterianas conhecidas para as bactérias envolvidas (Green & Clifton, 2017), tendo já sido utilizadas com sucesso moléculas pertencentes às classes das tetraciclina, cefalosporinas, fluoroquinolonas,  $\beta$ -lactâmicos ou macrólidos (Strobel *et al.*, 2014). Adicionalmente, é reconhecido que as taxas de recuperação podem ser muito elevadas se o tratamento for iniciado de forma precoce (Green & George, 2008).

A vacinação também pode ser uma ferramenta eficaz no controlo da doença, uma vez que, para além da ação preventiva, também se assume que poderá conferir algum efeito terapêutico em animais previamente infetados, acelerando o processo de cicatrização de lesões existentes (Liardet *et al.*, 1989). A vacina comercial *Footvax*<sup>®</sup>, única disponível em Portugal, contém várias estirpes inativadas de *D. nodosus*, sendo vulgarmente usada na Austrália (Dhungyel *et al.*, 2014) e no Reino Unido (Best *et al.*, 2020). Apesar de as vacinas multivalentes estarem associadas a uma reduzida e pouco duradoura produção de anticorpos (Dhungyel *et al.*, 2014), os trabalhos de Duncan *et al.*, (2012) revelaram uma eficiência global moderada (62%).

Existem ainda outras opções terapêuticas que podem ser utilizadas em programas de controlo ou de erradicação da doença, tais como a quarentena, o isolamento profilático dos animais infetados e o refugio de animais cronicamente infetados (Green & George, 2008; Winter, 2009).

O presente estudo tem como principal objetivo investigar a existência de potenciais fatores de risco para a emergência e desenvolvimento da doença no Alentejo, estimando o grau de prevalência desta doença na região. Os resultados serão obtidos com base em questionários (*Inquéritos Epidemiológicos*) aplicados diretamente a produtores de ovinos do Alentejo.

## **3.2 – Metodologia**

### **3.2.1 – População considerada no estudo**

A área de estudo escolhida foi a região Alentejo, uma vez que nesta região existe uma quantidade considerável de ovinos, distribuídos pelas explorações agropecuárias que existem ao longo do território desta região, que é o mais extenso do país (INE, 2017). Assim, a produção de ovinos ocupa uma posição bastante relevante na economia desta região, em virtude do peso que têm os recursos económicos envolvidos na produção e comercialização desta espécie e, naturalmente, da população ativa empregada nesta atividade. Refira-se que em 2016 o efetivo ovino do Alentejo rondava os 1.208.000 animais, representando 58,4% do total nacional (INE, 2017).

No que respeita aos dados estatísticos recolhidos, os quais atestam a importância desta atividade, verificamos que em janeiro de 2017 existiam registos de 8771 explorações pecuárias com ovinos no Alentejo. Este valor foi obtido com base nos dados recolhidos junto dos 11 Agrupamentos de Defesa Sanitária (ADS) do Alentejo.

### **3.2.2 – Determinação da dimensão da amostra**

Nos procedimentos aplicados para determinar a dimensão da amostra que suporta análise empírica da investigação, recorreremos à ferramenta analítica *Sample Size Calculator*<sup>7</sup>. A margem de erro definida para o estudo foi de 4 %, tendo sido atribuído um nível de confiança de 95 %, da qual resulta uma amostra mínima de 562 explorações, entre as 8771 que se encontravam registadas nos ADS's. A análise agregada, tendo em conta o nível de confiança e margem de erro definidos, permite-nos então afirmar que existe 95% de probabilidade de que a prevalência efetiva se situe entre  $[\mu-4; \mu+4]$ .

---

<sup>7</sup> O qual pode ser encontrado em <https://www.surveysystem.com/sscalc.htm#one>

### 3.2.3 – Elaboração do questionário epidemiológico

No âmbito do Projeto GEN-RES-Alentejo<sup>8</sup>, uma equipa de investigadores da UÉ e da ACOS desenhou e aplicou um *Inquérito Epidemiológico* com o objetivo de estimar a prevalência de peeira em explorações de ovinos na região Alentejo. O presente trabalho também teve como objetivo determinar os fatores de risco decorrentes da existência dessa doença na área geográfica considerada.

Em consequência, foi elaborado um questionário provisório, tendo sido aplicado um teste-piloto numa amostra de dez explorações. Posteriormente foram implementados ligeiros ajustes, em conformidade com as sugestões efetuadas pelos respondentes aos questionários. O texto final do *Inquérito Epidemiológico*, redigido em língua portuguesa, estava estruturado em três páginas (Anexo 3). A totalidade das questões envolvia respostas fechadas ou semifechadas (com uma opção *Outro*), de forma a reduzir a subjetividade das mesmas. As questões aplicadas envolviam quer respostas baseadas na aferição de evidências (exemplo, *Há partilha de caminhos ou de pastagens com efetivos de outras explorações?*) como respostas baseadas na opinião pessoal do respondente (exemplo, *Considera que o tipo de pedras presentes nas zonas de pastoreio dos animais poderá provocar lesões nas unhas dos animais?*).

Sobre a estrutura do inquérito, referimos que a sua primeira parte está focada na caracterização generalista da exploração, onde são recolhidos dados referentes à sua localização, área respetiva, número de ovinos existente, raças dos animais, espécies coabitantes, sistemas de estabulação, períodos temporais de cobertura e de ocorrência dos partos, tipologias de alimentação dos animais e, ainda, dados relativos ao padrão de solos dominante nas explorações. A segunda parte do inquérito está orientada para a caracterização da ocorrência de lesões associadas à peeira na exploração, registando-se para tal a proporção de animais afetados, a sazonalidade das manifestações clínicas e o tipo de estratégias utilizadas, quer na prevenção, quer no tratamento da doença, sempre que esta tenha sido diagnosticada.

### 3.2.4– Recolha de dados

Uma vez definido o conteúdo do questionário, passámos à fase operacional de aplicação do mesmo, concretizando o processo de recolha de informação. A aplicação foi feita sob a forma de entrevista aos proprietários de explorações de ovinos registadas num dos 11 ADS's do Alentejo<sup>9</sup>, os quais cobrem de forma extensiva quatro regiões de acordo com as Nomenclaturas das Unidades Territoriais (NUTS) III – Alto Alentejo, Alentejo Central,

---

<sup>8</sup> Informação detalhada sobre o mesmo pode ser consultada em <https://www.gen-res-alentejo.pt/>

<sup>9</sup> Em concreto, foram recolhidos inquéritos relativos aos 47 concelhos do Alentejo.

Baixo Alentejo e Alentejo Litoral. A fim de identificar as regiões alvo do estudo, a Tabela 3.1 apresenta a correspondência entre as sub-regiões referidas e os 11 agrupamentos.

*Tabela 3.1 – Correspondência entre as sub-regiões e os ADS's do Alentejo*

<b>Sub-região</b>	<b>ADS</b>
Alto Alentejo	Monforte
	Ponte de Sor
Alentejo Central	Estremoz
	Montemor-o-Novo
	Mourão
Baixo Alentejo	Beja
	Campo Branco
	Mértola
	Moura
	Serpa
Alentejo Litoral	Litoral Alentejano

Creemos ser importante referir que nem sempre existe uma correspondência direta entre os ADS's em que as explorações estão inscritas e as sub-regiões do Alentejo em que as explorações estão sediadas territorialmente. Esta situação deve-se ao facto de cada produtor dispor de liberdade para decidir sobre o ADS em que pretende inscrever a sua exploração, podendo assim optar por registá-la fora da área geográfica em que efetivamente se localiza, embora em termos práticos esta situação não tenha grande relevância, dado só ocorrer em casos excecionais.

A aplicação efetiva dos inquéritos decorreu entre o período de dezembro de 2016 e dezembro de 2017. As explorações abrangidas pelo questionário foram selecionadas de forma arbitrária, tendo os produtores sido informados sobre o anonimato da aplicação do inquérito e naturalmente sobre a confidencialidade das respostas, sendo de seguida questionados sobre a sua disponibilidade em responder ao mesmo. A parte mais significativa da recolha de dados sucedeu quando os produtores se deslocavam à sede dos ADS's para resolver questões administrativo-burocráticas relacionadas com a atividade das suas unidades, tendo-se aproveitado a ocasião para concretizar as entrevistas de modo presencial. Foram feitos todos os esforços no sentido de maximizar a precisão dos dados, através do pedido de fornecimento de respostas que fossem o mais honestas e objetivas possível, reforçando sempre o nosso dever de sigilo perante todos os dados fornecidos.

### **3.2.5 – Análise dos dados**

Antes de iniciarmos o processo de análise dos questionários aplicados, foi feita uma verificação sucinta quanto à eventual ocorrência de inconsistências nas respostas

recolhidas. Seguidamente, todos os dados recolhidos foram registados e processado o seu tratamento com recurso aos programas informáticos de análise de dados *Gret/ (version 1.1)* e *IBM SPSS Statistics (version 26)*. Tal procedimento, permitiu-nos determinar quer os valores das estatísticas descritivas quer as subseqüentes análises de regressão, dependendo do objetivo que estava em causa.

Posteriormente, foram efetuados testes de hipóteses com o propósito de averiguar a existência efetiva de associação estatística entre a multiplicidade de variáveis em observação e a presença ou ausência de peeira nas explorações consideradas. Nas análises efetuadas foram considerados quatro distintos níveis de confiança: 90, 95, 99 e 99,9%.

### **3.2.6 – Identificação de fatores de risco relacionados com a exploração e com as particularidades do tipo de manejo implementado**

A variável de resposta utilizada maioritariamente nesta análise foi a presença de peeira na exploração (Pergunta B1 – *O efetivo ovino teve peeira ao longo do ano 2016?* do Anexo 3). Inicialmente procedemos a uma análise univariada, de forma a indagar sobre a existência de conexões entre a ocorrência de peeira e as seguintes variáveis:

- Área geográfica (sub-região);
- Área da exploração;
- Dimensão do efetivo ovino;
- Raça dos animais;
- Presença de outras espécies coabitantes;
- Partilha de caminhos ou pastagens com efetivos de outras explorações;
- Origem dos animais de substituição;
- Participação em feiras e mercados;
- Sistema de estabulação;
- Existência de épocas de cobrição;
- Local onde decorrem os partos;
- Tipo de alimentação;
- Caracterização do tipo de solo (solos pedregosos, textura, drenagem e altitude);
- Existência de montado.

As variáveis quantitativas foram analisadas através da aplicação do teste *F da ANOVA*, enquanto nas variáveis qualitativas ou em classes foi utilizado o teste *Qui-quadrado*.

Posteriormente realizámos uma análise multifatorial, tendo recorrido a modelações com variável dependente discreta. Quando a variável dependente permitia uma escolha binária, foi usado um modelo *logit*, tal como explicado em Verbeek (2014). A construção destes modelos multivariados foi feita por via de uma estratégia de eliminação

regressiva, tal como utilizado nos trabalhos de Angell *et al.* (2014). Esta análise multivariada parte de um modelo inicial com um elevado número de variáveis independentes, as quais vão sendo progressivamente excluídas, tendo por base o critério de rejeição dos valores p mais elevados no teste t assintótico. O processo foi repetido sucessivamente até que somente variáveis com valores inferiores ao nível de significância definido permanecessem no modelo<sup>10</sup>.

De seguida, as variáveis omitidas foram de novo adicionadas, uma de cada vez, iniciando-se com as que apresentaram o valor p inferior, repetindo o teste t assintótico após cada adição, sendo que a variável só fica no modelo se o valor p for inferior ao nível de significância estabelecido. Este procedimento foi aplicado sucessivamente até esgotar as variáveis que reuniam requisitos para serem adicionadas, ficando definida a estrutura final do modelo. As interações entre as variáveis deste modelo foram avaliadas pela análise de correlação entre todos os “pares de variáveis”, de forma a decidir se seriam incluídas no modelo. O ajustamento do modelo final foi avaliado através do recurso ao teste de *Hosmer-Lameshow* para aferir a capacidade explicativa do modelo face a alterações da variável dependente, tal como utilizado nos trabalhos de Smith *et al.* (2014). No modelo final foram utilizadas todas as observações disponíveis para as variáveis incluídas, tendo sido excluídas aquelas em que se registaram valores omissos.

As seguintes 17 variáveis explicativas foram introduzidas no modelo inicial: área da exploração; efetivo total; animais em “linha pura”; animais de raça “cruzada”; coabitantes bovinos; coabitantes caprinos; partilha de caminhos e pastagens; participação em feiras e mercados; estabulação dos animais; concentração de partos; partos no ovil; pastoreio em regadio; pedras traumáticas; solo argiloso; solo mal drenado; baixa altitude dos terrenos; montado. Os critérios utilizados na determinação da variável dependente (*presença de peira*) e de cada uma das 17 variáveis independentes foram os seguintes:

- *Presença de peira*

A variável dependente é qualitativa e dicotómica, existindo apenas duas hipóteses, ou a exploração tem peira ( $Y=1$ ) ou a exploração não tem ( $Y=0$ ).

- *Área da exploração*

Esta é uma variável quantitativa contínua e refere-se à área da exploração, em hectares (ha), que é direta ou indiretamente utilizada na produção de ovinos.

- *Efetivo total*

É uma variável quantitativa discreta que se refere ao número total de ovinos adultos (machos e fêmeas) existentes na exploração. Estabeleceu-se o critério de que todos os

---

<sup>10</sup> Em concreto os valores foram de 0,05 para os modelos que consideravam todas as explorações da amostra e 0,1 para os modelos que contemplavam apenas as explorações com casos de peira.

animais registados na base de dados do Instituto de Financiamento da Agricultura e Pescas (IFAP) fossem considerados como sendo adultos.

- *Presença de animais de linha pura*

Esta é uma variável qualitativa binária, tendo sido dada a valoração *Sim* (Y=1) às explorações que produzem ovinos em “linha pura” (com inscrição no livro genealógico da raça), enquanto a valoração *Não* (Y=0) foi atribuída às explorações de ovinos que não possuem animais em “linha pura”.

- *Presença de animais cruzados*

Variável qualitativa binária, tendo sido atribuída a classificação *Sim* (Y=1) às explorações que têm ovinos de raça cruzada (descendentes resultantes do cruzamento de progenitores de raças distintas), enquanto a classificação *Não* (Y=0) foi atribuída às explorações de ovinos que não têm animais de raça cruzada.

- *Coabitantes bovinos*

Variável qualitativa binária, tendo sido atribuída a classificação *Sim* (Y=1) às explorações que, para além da produção de ovinos, também se dedicam à produção da espécie bovina. A classificação *Não* (Y=0) foi assim atribuída às explorações que não possuem bovinos no seu efetivo.

- *Coabitantes caprinos*

Esta é uma variável qualitativa binária, tendo sido atribuída a notação *Sim* (Y=1) às explorações que, para além da produção de ovinos, também se dedicam à produção da espécie caprina. A classificação *Não* (Y=0) foi assim atribuída às explorações que não possuem caprinos no seu efetivo.

- *Partilha de caminhos e pastagens*

Esta é uma variável qualitativa binária, tendo sido atribuída a classificação *Sim* (Y=1) às explorações que usam caminhos e/ou pastagens que também são utilizados por efetivos pertencentes a outras explorações agropecuárias. Por seu lado, a classificação *Não* (Y=0) foi atribuída às explorações que não partilham qualquer área com outras explorações.

- *Participação em feiras e mercados*

Esta é uma variável qualitativa binária, tendo sido atribuída a classificação *Sim* (Y=1) às explorações que participam em mercados e/ou feiras pecuárias, enquanto a classificação *Não* (Y=0) foi atribuída às explorações em que não ocorre participação nesse tipo de eventos com os seus animais.

- *Estabulação dos animais*

Esta é uma variável qualitativa binária, tendo sido atribuída a classificação *Sim* (Y=1) às explorações que estabulam os seus animais (durante todo o ano ou apenas em alguns períodos). Por seu turno, a classificação *Não* (Y=0) foi atribuída às explorações que têm os seus ovinos permanentemente “a campo”.

- *Concentração de partos*

Esta é uma variável qualitativa binária, tendo sido atribuída a classificação *Sim* (Y=1) às explorações em que os partos ocorrem em determinados períodos do ano, visto que os carneiros se encontram separados das ovelhas em alguns períodos. Por sua vez, a classificação *Não* (Y=0) foi atribuída às explorações em que os partos podem ocorrer ao longo de todo o ano, visto que os machos estão permanentemente com as fêmeas.

- *Partos no ovil*

Esta é uma variável qualitativa binária, tendo sido atribuída a classificação *Sim* (Y=1) às explorações em que os partos das ovelhas ocorrem dentro do ovil (quando as fêmeas estão estabuladas). Desta forma, a classificação *Não* (Y=0) foi atribuída às explorações em que todos os partos acontecem no campo (sem que as fêmeas estejam estabuladas).

- *Pastoreio em regadio*

Esta é uma variável qualitativa binária, tendo sido atribuída a classificação *Sim* (Y=1) às explorações em que os animais se alimentam em pastagens em que o regadio é o regime hídrico implementado, enquanto nas explorações categorizadas com a classificação *Não* (Y=0) a alimentação dos animais é feita em pastagens cujo regime hídrico instituído é o sequeiro.

- *Pedras traumáticas*

Esta é uma variável qualitativa binária, tendo sido atribuída a classificação *Sim* (Y=1) às explorações cujos produtores consideram que a existência de terrenos pedregosos nas zonas de pastoreio dos ovinos poderá ser responsável por provocar lesões nas extremidades distais dos membros. Por seu lado, a classificação *Não* (Y=0) foi atribuída às explorações em que não foi reportada a existência de pedras responsáveis por causarem traumatismos nas úngulas dos animais.

- *Solo argiloso*

Esta é uma variável qualitativa em que os produtores são inquiridos quanto à textura do solo da área da exploração. As quatro opções de resposta existentes são *grosseira* (solo pedregoso), *intermédia* (arenoso), *fin*a (medianamente argiloso) e *muito fina* (muito argiloso). Nesta questão podem ser assinaladas mais do que uma resposta, caso a heterogeneidade do solo existente assim o justifique. O critério utilizado consistiu na atribuição da classificação *Sim* (Y=1) às explorações que têm solos de textura fina e/ou muito fina, independentemente de também existirem áreas com textura grosseira ou intermédia. Por seu turno, as explorações classificadas com *Não* (Y=0) foram aquelas que só têm áreas de textura intermédia e/ou grosseira.

- *Solo mal drenado / alagadiço*

Esta variável qualitativa configura a resposta dos produtores inquiridos quanto à capacidade de drenagem do solo existente na exploração. As quatro opções de

resposta<sup>11</sup> são *boa drenagem, capacidade de drenagem moderadamente alta, capacidade de drenagem moderadamente baixa e má drenagem*, podendo existir mais do que uma resposta caso a heterogeneidade dos solos face à capacidade de drenagem o justifique. O critério usado consistiu na atribuição da classificação *Sim* (Y=1) às explorações com solos com reduzida capacidade de drenagem, independentemente de também existirem áreas com boa capacidade de drenagem ou capacidade de drenagem moderadamente alta. Por seu turno, as explorações classificadas com *Não* (Y=0) foram aquelas que só têm áreas com boa capacidade de drenagem e/ou capacidade de drenagem moderadamente alta.

- *Baixa altitude*

Esta é uma variável qualitativa em que os produtores são inquiridos sobre a altitude dos locais onde os animais permanecem. As três opções de resposta existentes são *baixa altitude* (várzea ou próximo da linha de água), *altitude intermédia* (parte inferior da encosta ou meia encosta) e *alta altitude* (cerros, colinas ou cumeadas), sendo que podem ser dadas mais do que uma resposta caso as diversas áreas se insiram nas distintas classes de altitude. Todas as explorações com áreas de baixa altitude (várzeas ou próximo da linha de água), independentemente de também poderem existir áreas de altitude superior, foram classificadas com *Sim* (Y=1). As restantes explorações, que só têm áreas de altitude superior, foram englobadas na classificação *Não* (Y=0).

- *Presença de montado*

Esta é uma variável qualitativa, tendo sido atribuída a notação *Sim* (Y=1) às explorações que têm áreas com montado (sobro e/ou azinho) nas zonas em que os ovinos pastoreiam, mesmo que o montado não cubra a totalidade da superfície da exploração. Por seu turno, a classificação *Não* (Y=0) foi atribuída às explorações que não têm qualquer área com montado nos locais de permanência dos ovinos.

### **3.2.7 – Identificação de fatores de risco relacionados com a prevenção e tratamento da doença**

Na segunda parte do inquérito, foi tida em conta a proporção do efetivo que apresentou lesões de peira durante o ano 2016. Noutra questão (B5 do Anexo 3), os inquiridos registaram os meses em que foi possível observar casos clínicos da doença.

Relativamente às ações preventivas e terapêuticas, os respondentes foram interrogados sobre quais as medidas que eram implementadas na sua exploração, tendo nove

---

<sup>11</sup> As hipóteses de resposta estão relacionadas com a possibilidade de os terrenos ficarem alagados em consequência da sua capacidade de retenção da pluviosidade.

hipóteses de resposta<sup>12</sup> possíveis. No caso do *Pedilúvio* e da *Vacinação* foi ainda elaborada uma análise mais aprofundada.

Realizámos uma análise comparativa entre as estratégias mais utilizadas, quer nas explorações com doença quer nas que não reportaram a sua existência. Naturalmente que a proporção de produtores que utiliza as diversas opções terapêuticas é bastante superior nas explorações que têm peeira quando comparadas com as restantes. Desta forma, caso tivesse sido aplicada metodologia similar à usada na identificação de fatores de risco relacionados com o manejo da exploração, concluiríamos que todos os procedimentos seriam potenciais fatores de risco. Logo, para aferir sobre a existência de procedimentos profiláticos/terapêuticos que sejam fatores protetores ou de risco, consideraram-se apenas as explorações que tinham casos de peeira. Para isso privilegiou-se a utilização de modelos em que a variável dependente (*presença de peeira*) pode assumir múltiplos valores, nomeadamente o modelo *logit ordenado* (Delle Site *et al.*, 2019). Os valores assumidos para a variável dependente foram 1 (residual), 2 (moderada) e 3 (grave), em função da proporção de ovinos afetados (pergunta B2 do Anexo 3). Desta forma, utilizámos uma metodologia semelhante à descrita em 3.2.6, tendo iniciado com um modelo que contemplava as nove variáveis, as quais foram sendo sucessivamente extraídas, até que no final permaneceram aquelas que revelaram maior significância estatística (valor  $p < 0,1$ ).

### **3.3 – Resultados**

#### **3.3.1 – Caracterização da amostra**

No global foram recolhidos 689 inquéritos válidos, sendo que nem todos os produtores responderam à totalidade das questões colocadas. A repartição territorial das explorações avaliadas foi a seguinte: 281 (40,8 %) unidades localizam-se na sub-região do Baixo Alentejo, 175 (25,4 %) integram a sub-região do Alentejo Central, 125 (18,1 %) estão localizadas no Alto Alentejo e, finalmente, 108 (15,7 %) situam-se no Alentejo Litoral.

No que respeita à distribuição dos inquéritos por ADS onde a unidade pecuária está registada, o número de inquéritos recolhidos variou entre o valor mínimo de 18 (Moura) e máximo de 98 (Monforte). A Tabela 3.2 apresenta com detalhe a repartição dos inquéritos obtidos pelos 11 ADS's do Alentejo considerados, bem como a taxa de cobertura no seio de cada agrupamento. No total, as 689 explorações pecuárias

---

<sup>12</sup> Que são o pedilúvio, podiatria, antibioterapia tópica, antibioterapia sistémica, separação dos animais afetados, vacinação, mudança das camas, tratamento das camas e quarentena.

inquiridas correspondem a 7,9% do universo das explorações de pequenos ruminantes sediadas no Alentejo.

Tabela 3.2 – Distribuição dos inquéritos respondidos por ADS, número de explorações existentes e respetiva fração correspondente

ADS	Inquéritos aplicados	Explorações registadas	Explorações Inquiridas (%)
Beja	81	646	12,5
Campo Branco	96	972	9,9
Estremoz	63	1394	4,5
Litoral Alentejano	96	867	11,1
Mértola	43	255	16,9
Monforte	98	1600	6,1
Montemor-o-Novo	90	1366	6,6
Moura	18	308	5,8
Mourão	28	257	10,9
Ponte de Sor	28	650	4,3
Serpa	48	456	10,5
<b>Total</b>	<b>689</b>	<b>8771</b>	<b>7,86</b>

Para além dos 689 produtores que responderam ao inquérito, houve ainda 63 proprietários que foram abordados, mas que por motivos vários acabaram por não responder ao questionário. A Tabela 3.3 regista o motivo apresentado para a não participação no inquérito.

Tabela 3.3 – Motivos apresentados para não responder ao inquérito

Motivo	Nº de produtores
Demasiado ocupado / Sem tempo	29
Não tem interesse em responder	16
Desconhece os dados da exploração	11
Não pretende divulgação dos dados	5
Sem ovinos na exploração	2
<b>Total</b>	<b>63</b>

### 3.3.2 – Caracterização das explorações inquiridas

Os valores referentes à estatística descritiva das variáveis *área total*, *área destinada aos animais* e *dimensão do efetivo* encontram-se expressas na Tabela 3.4. Da sua observação destacamos a existência de uma elevada heterogeneidade, tal como expresso pela elevada amplitude dos três fatores em análise.

Tabela 3.4 – Estatísticas descritivas referentes às variáveis área total, área dos animais e efetivo

Variáveis	Unidade	Amostra	Média	Mediana	Q1 – Q3	Mín – Máx	$\sigma$
Área total	ha	686	240,9	120	25 – 330	0,5 – 3000	327,1
Área animais	ha	681	164,4	70	20 – 208	0,5 – 2000	236,7
Efetivo animal	Animais adultos	687	273,2	179	59 – 379	3 – 3446	324,7

Da observação dos Gráficos 3.1 e 3.2, relativos à distribuição das explorações de acordo com a sua área total e área destinada aos ovinos, respetivamente, realçamos que a classe compreendida entre 100 e 500 ha foi a mais representada nas duas classificações.

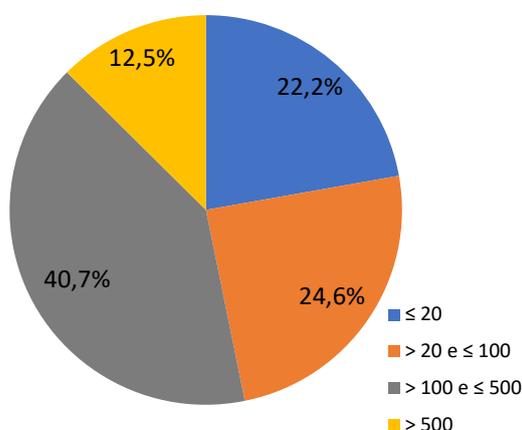


Gráfico 3.1 – Distribuição das explorações de acordo com a área total (ha; n=686)

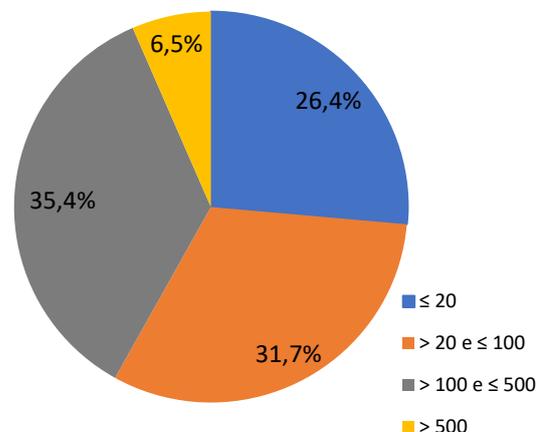


Gráfico 3.2 – Distribuição das explorações de acordo com a área dos animais (ha; n=681)

No que respeita à dimensão do efetivo, a repartição por classes demonstrou que a correspondente a um maior número de ovinos adultos (> 300) foi a mais representada (34,5% das explorações), tal como podemos constatar através da observação do Gráfico 3.3.

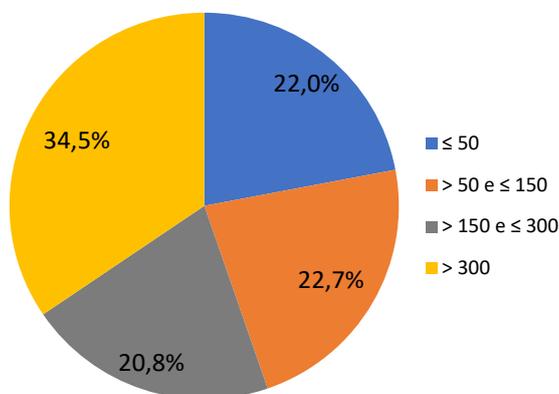


Gráfico 3.3 – Distribuição das explorações de acordo com a dimensão do efetivo (n=687)

Conjugando a análise destas variáveis com a presença ou ausência de peeira nas explorações, verificamos que existem diferenças notórias entre os dois grupos considerados. Para a *área total*, a superfície média das explorações onde foram reportados casos de peeira foi de 330,1 ha, enquanto naquelas em que não foram observadas lesões compatíveis com a doença o valor médio foi 193,5 ha. A tendência na *área destinada aos animais* foi idêntica, já que a área média nas herdades com registos de peeira foi de 228,3 ha, enquanto para as explorações sem a doença o valor médio foi 130,5 ha. Finalmente, o número médio de ovinos nas explorações com peeira foi 407, enquanto nas outras unidades pecuárias o efetivo médio rondou os 203 animais.

No que concerne às raças de ovinos existentes nas unidades pecuárias, os produtores foram inquiridos sobre a existência de animais de raça cruzada (685 respostas), sendo que 85,4% afirmaram possuir animais cruzados na exploração. Adicionalmente, os produtores foram questionados se possuíam animais de linha pura (inscritos nos livros genealógicos da raça) (686 respostas), sendo que 16,8 % responderam positivamente. Dentro das raças autóctones, registaram-se seis raças distintas repartidas por 75 produtores, sendo que as raças mais referidas foram a merina branca, a merina preta e a campaniça. No caso das raças exóticas, registaram-se 12 raças diferentes distribuídas por 48 produtores, sendo as raças *lacaune*, *suffolk*, *île de France* e *INRA 401* as mais recorrentes. A Tabela 3.5 regista a repartição das raças mais frequentemente referidas nas explorações inquiridas.

Tabela 3.5 – Raças mais frequentes nas explorações de ovinos do Alentejo

Raça	Nº de explorações	% de explorações
Merina Branca	39	5,74
Merina Preta	29	4,26
Campaniça	16	2,35
<i>Lacaune</i>	15	2,21
<i>Suffolk</i>	10	1,47
Île de France	8	1,18
INRA 401	7	1,03

### 3.3.3 – Caracterização da doença nas explorações

Do conjunto das explorações inquiridas, 34,54% dos produtores afirmaram ter observado casos de peeira na respetiva exploração, durante o ano de 2016. Em virtude deste registo sobre a existência da doença, podemos referir com 95% de confiança que a prevalência real estará situada entre 30,54 e 38,54%. Focando apenas os produtores

que afirmam ter a doença na exploração, 97,9% referem que a doença se expressa no efetivo adulto, enquanto nos animais de substituição essa proporção é ligeiramente superior a metade (56,7%). Os produtores foram desafiados a apontar qual a percentagem de animais que tinha evidenciado sinais clínicos de peeira ao longo do ano 2016. A dificuldade em responder com precisão a esta questão por parte dos inquiridos, que foi manifestada durante a implementação do teste piloto, fez com que a versão final do *Inquérito Epidemiológico* agrupasse estas respostas em classes (pergunta B2 do Anexo 3). Deste modo, as categorias consideradas foram as seguintes: inferior a 10% dos animais (residual); entre 10 e 30% (moderada); superior a 30% (grave).

Ambos os grupos avaliados (efetivos de substituição e adultos) registaram proporções similares em cada uma das classes, tal como podemos verificar na Tabela 3.6. Assim, constatámos que, tanto no efetivo adulto como nos animais de substituição, a classe menos severa (menos de 10% dos animais exibiram lesões de peeira) foi a mais frequente, englobando cerca de 2/3 das respostas. A categoria seguinte, em que entre 10 e 30% dos animais evidenciaram lesões de peeira, foi atribuída a cerca de 28% das explorações. Por fim, a classe mais grave (mais de 30% dos ovinos afetados) rondou os 5% do total de respostas.

*Tabela 3.6 – Proporção de ovinos com expressão clínica de peeira no ano de 2016*

<b>Classe de proporção</b>	<b>Animais de substituição (n = 135)</b>	<b>Efetivo adulto (n = 233)</b>
<b>Residual</b>	91 (67,4 %)	157 (67,4 %)
<b>Moderada</b>	37 (27,4 %)	66 (28,3 %)
<b>Grave</b>	7 (5,2 %)	10 (4,3 %)

No que respeita à sazonalidade das manifestações clínicas durante o ano 2016 (689 respostas), os meses em que um maior número de produtores reportou casos clínicos de doença foram março (142), fevereiro (123) e janeiro (101) (Gráfico 3.4), correspondendo às respetivas prevalências mensais de 20,6, 17,9 e 14,7%. No contexto exclusivo das explorações onde foram observados casos de peeira, o padrão mais frequente de ocorrência de casos clínicos registou-se nos meses de março–abril (3,9%) e fevereiro–março (2,9%). O motivo principal para estes aparentemente reduzidos valores relativos prende-se com o facto de terem sido identificados 59 padrões de resposta diferentes.

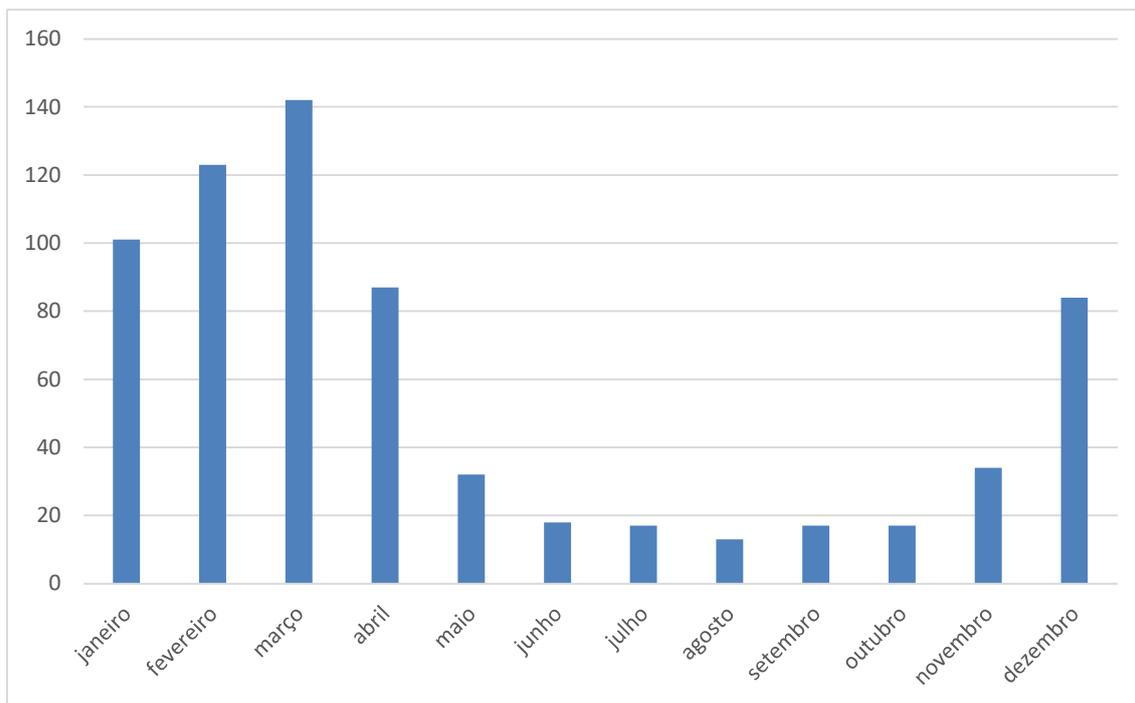


Gráfico 3.4 – Histograma contendo o número de explorações que apresentaram casos de peeira ao longo dos meses do ano de 2016

### 3.3.4 – Determinação de fatores de risco relacionados com o tipo de manejo – Análise univariada

No que respeita à dimensão territorial da amostra, verificamos que a prevalência média por exploração nas diferentes sub-regiões do Alentejo apresenta uma diferença estatisticamente significativa (689 respostas). De facto, as taxas de prevalência mais elevadas registaram-se no Alto Alentejo (46,4%) e no Alentejo Central (37,1%), enquanto o Alentejo Litoral (23,1%) e o Baixo Alentejo (32%) apresentaram prevalência mais reduzida.

A superfície total da exploração foi outro dos fatores em que foram evidenciadas diferenças significativas (686 respostas) relativamente à probabilidade de possuírem a doença na respetiva exploração. Entre as unidades com área superior ou igual a 500 ha, 55,8% declararam registos da doença. Nas explorações com área compreendida entre 100-500 ha a probabilidade de existir peeira é de 39,4%. Nas explorações com menor dimensão a proporção dos animais que evidenciaram sinais da doença foi ainda menor (21,1% para unidades com área inferior a 20 ha e 28,4% para as que têm área entre 20-100 ha). Se equipararmos apenas entre explorações com área maior e menor do que 100 ha, verificamos que a probabilidade de as primeiras terem peeira é superior ao dobro da evidenciada pelas últimas (OR= 2,2994; valor  $p < 0,001$ ; IC a 95% [1,66; 3,19]). Pudemos assim aferir que as unidades que dispõem de uma maior superfície registaram, de forma expressiva, uma superior probabilidade de serem alvo da doença (Tabela 3.7).

Afinando a análise, fomos aferir se a parcela da área da exploração diretamente utilizada pelos ovinos tem relevância nos resultados (681 respostas). Assim, constatamos que a tendência é similar à registrada para o fator anterior, ou seja, quanto maior a área disponível, maior a percentagem de unidades pecuárias com relatos de doença, apresentando um valor máximo (56,8%) para as explorações com mais de 500 ha destinados aos ovinos, enquanto o valor mínimo foi observado nas unidades que dispõem de um máximo de 20 ha (19,4%) (Tabela 3.7). Pela comparação das explorações com área destinada aos ovinos inferior e superior a 100 ha, concluímos que as que possuem maior área manifestam uma probabilidade de terem animais com peeira 2,4 vezes superior às de menor área, o que é significativo em termos da análise estatística (OR=2,3575; valor  $p < 0,001$ ; IC a 95% [1,71; 3,26]).

Em outro sentido, também a dimensão do efetivo (687 respostas) se revelou um fator de vulnerabilidade que potencia a presença de peeira na exploração, dado que quanto mais animais integram o efetivo, maior a probabilidade de a doença estar presente. As explorações com efetivos superiores ou iguais a 400 animais (53,8%) e com o número compreendido entre 150-400 (39,1%) revelaram prevalências bastante superiores às explorações com até 50 animais (13,8%) ou com efetivo compreendido entre 50 e 150 ovinos (28,4%) (Tabela 3.7). Se confrontarmos apenas explorações com um efetivo superior ou inferior a 150 animais concluímos que a probabilidade de uma exploração com mais do que 150 ovinos ter animais com a doença é cerca de três vezes superior à registrada nas explorações com menos do que 150 animais (OR=3,0787; valor  $p < 0,001$ ; IC a 95% [2,19; 4,33]).

Outro dos fatores investigados, onde foi possível identificar uma relação estatisticamente significativa com a ocorrência de peeira, foi a existência de coabitantes da espécie bovina (689 respostas). De facto, das explorações que têm bovinos a coabitar com ovinos, 41,9% revelaram sinais de peeira, enquanto nas explorações sem bovinos a prevalência ronda os 31,2%. Desta forma, as explorações que se dedicam, simultaneamente à produção de ovinos e bovinos manifestam uma probabilidade cerca de 1,5 vezes superior de poderem ter peeira, comparativamente com as que não se dedicam à produção de bovinos (Tabela 3.7).

O recurso à estabulação dos animais também se revelou um fator de risco para a presença de peeira nas explorações (689 respostas). Entre as 186 explorações que realizam estabulação, 42,5% têm peeira, enquanto que das 503 explorações que não realizam estabulação, a proporção com registo da doença baixa para 31,6%. Logo, as explorações que realizam estabulação apresentam uma probabilidade de terem peeira aproximadamente 1,5 vezes superior, quando comparadas com aquelas que não recorrem a esta opção (Tabela 3.7).

Tabela 3.7 – Análise univariada dos fatores da exploração e a sua relação com a ocorrência de peira (variáveis significativas ( $p \leq 0,05$ ))

Variável (n)	Nº explorações com peira	% explorações com peira	OR	IC 95 %	Valor p
<b>Sub-região (689)</b>					
Alentejo Litoral (108) (Base)	25	23,1			
Baixo Alentejo (281)	90	32	1,5644	[0,74; 2,61]	0,0871
Alentejo Central (175)	65	37,1	1,9618	[1,14; 3,37]	< 0,05
Alto Alentejo (125)	58	46,4	2,874	[1,63; 5,08]	< 0,001
<b>Área total (686)</b>					
≤ 20 ha (152) (Base)	32	21,1			
> 20 e ≤ 100 ha (169)	48	28,4	1,4876	[0,89; 2,49]	0,1296
> 100 e ≤ 500 ha (279)	110	39,4	2,4408	[1,54; 3,86]	< 0,001
> 500 ha (86)	48	55,8	4,7368	[2,66; 8,44]	< 0,001
<b>Área ovinos (681)</b>					
≤ 20 ha (180) (Base)	35	19,4			
> 20 e ≤ 100 ha (216)	70	32,4	1,9863	[1,25; 3,17]	< 0,01
> 100 e ≤ 500 ha (241)	106	44	3,2529	[2,08; 5,09]	< 0,001
> 500 ha (44)	25	56,8	5,4511	[2,7; 10,99]	< 0,001
<b>Efetivo animal (687)</b>					
≤ 50 (152) (Base)	21	13,8			
> 50 e ≤ 150 (155)	44	28,4	2,4721	[1,39; 4,41]	< 0,01
> 150 e ≤ 400 (220)	86	39,1	4,0036	[2,35; 6,83]	< 0,001
> 400 (160)	86	53,8	7,2497	[4,16; 12,64]	< 0,001
<b>Coabitantes bovinos (689)</b>					
Não (474)	148	31,2			
Sim (215)	90	41,9	1,5859	[1,14; 2,21]	< 0,01
<b>Estabulação (689)</b>					
Não (503)	159	31,6			
Sim (186)	79	42,5	1,5974	[1,13; 2,26]	< 0,01
<b>Época de partos (688)</b>					
Todo o ano (345)	89	25,8			
Concentrada (343)	148	43,1	2,1831	[1,58; 3,01]	< 0,001
<b>Participação em feiras (687)</b>					
Não (616)	202	32,8			
Sim (71)	36	50,7	2,1018	[1,29; 3,46]	< 0,01
<b>Capacidade de drenagem (688)</b>					
Boa (661)	220	33,3			
Má (27)	18	66,2	4,0091	[1,77; 9,07]	< 0,001
<b>Baixa altitude (689)</b>					
Não (498)	161	32,3			
Sim (191)	77	40,3	1,4138	[1,00; 2,00]	< 0,05
<b>Montado (688)</b>					
Não (163)	35	21,5			
Sim (525)	203	38,7	2,3056	[1,53; 3,48]	< 0,001

A concentração das épocas de cobrição/partos em determinados períodos do ano é outro fator de risco para a ocorrência de peeira nas explorações de ovinos (688 respostas). Na verdade, 43,1% das explorações com épocas de cobrição e partos definidas têm peeira, enquanto no grupo das unidades que não separam os carneiros ao longo do ano apenas 25,8% delas possuem peeira. Assim, as explorações do primeiro grupo registam uma probabilidade de ocorrência de peeira cerca de duas vezes superior, comparativamente com aquelas que não têm épocas definidas (Tabela 3.7).

O facto de as explorações disporem de áreas de montado nos locais onde habitualmente os animais vivem também revelou uma correlação positiva com a ocorrência de doença (688 respostas). De facto, 38,7% das explorações que têm montado possuem registos de peeira, enquanto esse valor se reduz para 21,5 % no caso das unidades que não têm ovinos em zonas de montado (Tabela 3.7).

A participação dos animais em eventos como feiras e exposições também se revelou um fator de risco adicional (687 respostas), uma vez que 50,7 % das explorações que declaram ter participado nesse tipo de eventos têm peeira e no caso das explorações que não participam em feiras essa percentagem reduz para 32,8 % (Tabela 3.7), pelo que a exposição dos animais a ambientes menos controlados duplica o risco de apresentar casos compatíveis com a doença.

No que respeita às condições de drenagem dos solos (688 respostas), a presença de terrenos com fraca capacidade de drenagem revelou-se também como um fator de risco para a presença de peeira na exploração. De facto, 66,2% das explorações com terrenos com baixa capacidade de drenagem revelaram ter peeira nos seus rebanhos, enquanto nas explorações com boa capacidade de drenagem a percentagem foi mais diminuta (33,3 %). Esta situação faz com que a probabilidade de uma exploração que possua solos com fraca capacidade de drenagem ter a doença seja quatro vezes superior à apresentada pelas explorações que não têm esse tipo de solos (Tabela 3.7).

No que respeita à altimetria dos terrenos (689 respostas), a baixa altitude revelou-se também um fator de risco para a presença de peeira na exploração. Considerando as explorações que utilizam áreas de várzea ou próximas da linha de água para pastoreio dos ovinos, registámos que 40,3% delas detetaram casos de peeira. Nas restantes explorações a proporção rondou os 32,3% (Tabela 3.7).

Após termos apresentado todas as variáveis em que foi possível identificar uma correlação estatisticamente significativa com a presença de peeira nos efetivos, passamos a mencionar aquelas que não aparentam constituir fatores de risco para a doença no Alentejo. Exposta a situação, para as restantes variáveis tratadas não foi possível encontrar evidência estatística significativa (valor  $p > 0,05$ ) que as relacionasse com a ocorrência de peeira nas respetivas unidades pecuárias. Essas variáveis não significativas na análise univariada vêm discriminadas na Tabela 3.8.

Tabela 3.8 – Análise univariada dos fatores da exploração e a sua relação com a ocorrência de peeira (variáveis sem significância ( $p > 0,05$ ))

Variável (n)	Nº explorações com peeira	% explorações com peeira	OR	IC 95 %	Valor p
<b>Linhas puras (686)</b> Não (571) Sim (115)	196 42	34,3 36,5	1,1008	[0,73; 1,67]	0,6518
<b>Cruzamento de raças (685)</b> Não (100) Sim (585)	38 200	38,0 34,2	0,8476	[0,55; 1,31]	0,4597
<b>Raças</b> <i>Suffolk</i> (7) (Base) Merina Branca (28) Merina Preta (16) Campaniça (14) <i>Lacaune</i> (13)	2 13 5 5 5	28,6 46,4 31,3 35,7 38,5	2,1667 1,1364 1,3889 1,5625	[0,36; 13,11] [0,16; 8] [0,19; 9,97] [0,21; 11,4]	0,3999 0,8978 0,7439 0,6593
<b>Coabitantes caprinos (689)</b> Não (532) Sim (157)	187 51	35,1 32,5	0,8877	[0,61; 1,3]	0,5371
<b>Partilha de pastagens (688)</b> Não (445) Sim (243)	159 79	35,7 32,5	0,8665	[0,62; 1,21]	0,3962
<b>Substituição fora do efetivo (680)</b> Não (600) Sim (80)	208 26	34,7 32,5	0,9074	[0,55; 1,49]	0,7017
<b>Partos no ovil (687)</b> Não (556) Sim (131)	191 47	34,4 35,9	1,0692	[0,72; 1,59]	0,7414
<b>Pastoreio em regadio (686)</b> Não (601) Sim (85)	210 27	34,9 31,8	0,8667	[0,53; 1,41]	0,5645
<b>Blocos minerais (686)</b> Não (416) Sim (270)	143 92	34,4 34,1	0,9867	[0,71; 1,36]	0,9353
<b>Solo argiloso (688)</b> Não (288) Sim (400)	88 149	30,6 37,3	1,3491	[0,98; 1,86]	0,0687
<b>Pedras traumáticas (688)</b> Não (519) Sim (169)	173 64	33,3 37,9	1,219	[0,85; 1,75]	0,2815

### 3.3.5 – Determinação de fatores de risco relacionado com o tipo de manejo – Análise multifatorial

O modelo aplicado foi construído através da estratégia de eliminação regressiva, até que todas as variáveis independentes apresentassem uma significância inferior a 0,05. Assim, o modelo final obtido englobou as cinco variáveis *Efetivo*, *Concentração de partos*, *Má drenagem*, *Baixa altitude* e *Montado* (Tabela 3.9). Refira-se que as cinco variáveis restantes no modelo final apresentam um coeficiente com sinal positivo, o que significa que aumentam a possibilidade de ocorrência de peeira em cada exploração. A matriz de frequências cruzadas relativa ao referido modelo está apresentada na Tabela 3.10, enquanto os seus parâmetros epidemiológicos precisão, sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) estão expostos na Tabela 3.11.

Tabela 3.9 – Modelo multifatorial final para os fatores de manejo (logit; n=684)

Variável dependente: Peeira nas explorações	Coeficiente	Erro padrão	Declive	Valor p
<b>Efetivo</b>	0,00201993	0,000339008	0,000447661	< 0,001
<b>Concentração de partos</b>	0,491342	0,177553	0,108584	< 0,01
<b>Má drenagem</b>	1,22840	0,441467	0,296553	< 0,01
<b>Baixa altitude</b>	0,524483	0,195059	0,141986	< 0,01
<b>Montado</b>	0,689221	0,229884	0,120003	< 0,01
Constante	- 2,21808	0,246671		< 0,001
Hosmer-Lemeshow (8 graus de liberdade) = 0,746				
R <sup>2</sup> McFaden = 0,112448		R <sup>2</sup> ajustado = 0,098833		
Critério Akaike = 794,3091		Critério Schwarz = 821,4768		

Tabela 3.10 – Matriz de frequências cruzadas do modelo multifatorial referente aos fatores de manejo

		Predito	
		Não	Sim
Real	Não	404	44
	Sim	160	76

Tabela 3.11 – Parâmetros epidemiológicos do modelo multifatorial referente aos fatores de manejo

Parâmetros	Valores
<b>Nº Variáveis</b>	5
<b>Precisão (%)</b>	70,2
<b>IC95% Precisão</b>	[66,6; 73,6]
<b>Sensibilidade (%)</b>	32,2
<b>Especificidade (%)</b>	90,2
<b>VPP (%)</b>	63,3
<b>VPN (%)</b>	71,3

### 3.3.6 – Prevenção e tratamento de peeira

Considerando agora as ações de prevenção e tratamento face à doença, interessa analisar de forma separada as explorações que registaram, ou não, casos de peeira, visto que as necessidades e prioridades de ambas são totalmente distintas. Nas explorações que reportaram a doença (n=238), praticamente a totalidade dos produtores assumiu que adota procedimentos terapêuticos e/ou profiláticos para o controlo e prevenção da peeira (99,2 %), sendo que apenas dois deles declararam não realizar qualquer ação nesse sentido. No caso das explorações livres de peeira em 2016 (n=451), a parcela que refere adotar medidas preventivas é naturalmente mais reduzida (25,9%).

Entre as 117 explorações que não têm a doença e que realizam algum tipo de prevenção, as ações ou combinação de procedimentos mais frequentemente utilizadas foram a podiatria (35,9%), a vacinação (14,5%) e a associação do pedilúvio com a correção podal (10,3%). A Tabela 3.12 apresenta as frequências relativas de cada um dos procedimentos nas explorações em que a doença está ausente.

Tabela 3.12 – Ações de prevenção para a peeira realizadas nas explorações que não reportaram casos clínicos (n=451)

	Pedilúvio	Podiatria	AB tópica	AB sistémica	Separação	Vacina	Mudança das camas	Tratamento das camas	Quarentena
Nº	36	83	27	16	6	30	3	1	1
%*	8,0	18,4	6,0	3,5	1,3	6,7	0,7	0,2	0,2
%**	30,8	70,9	23,1	13,7	5,1	25,6	2,6	0,9	0,9

Legenda: %\* – Percentagem de cada procedimento, relativamente à totalidade de explorações que assumem não ter a doença (n=451); %\*\* – Percentagem de cada procedimento, relativamente à totalidade de explorações que assumem não ter a doença e que realizam algum tipo de prevenção (n=117); Antibioterapia (AB).

Entre as 238 explorações que afirmam ter casos de peeira no seu efetivo ovino, as três combinações de procedimentos terapêuticos mais recorrentes foram as seguintes:

- Pedilúvio + Corte corretivo de úngulas + Antibioterapia tópica – representam 14,7% dos casos;
- Pedilúvio + Corte corretivo de úngulas + Antibioterapia tópica + Antibioterapia sistémica – correspondentes a 14,3% das respostas;
- Pedilúvio + Corte corretivo de úngulas + Antibioterapia tópica + Antibioterapia sistémica + Separação dos animais afetados – equivalente a 10,1 % das explorações.

A Tabela 3.13 retrata as frequências relativas de cada uma das ações terapêuticas e preventivas nas explorações em que foram reportados casos de peeira.

Tabela 3.13 – Ações preventivas e terapêuticas para a peeira realizadas nas explorações que reportaram casos clínicos (n=238)

	Pedilúvio	Podiatria	AB tópica	AB sistémica	Separação	Vacina	Mudança das camas	Tratamento das camas	Quarentena
Nº	176	208	202	146	83	51	19	2	1
%	73,9	87,4	84,9	61,3	34,9	21,4	8,0	0,8	0,4

### 3.3.6.1 – Pedilúvio

Relativamente à finalidade da utilização do pedilúvio (208 respostas), a maior fração (62,5%) afirma que a sua utilização se deve tanto à sua função terapêutica como preventiva. A restante fração divide-se de forma semelhante entre cada uma dessas funções de forma isolada (Tabela 3.14). No que diz respeito à composição da solução que é colocada no interior da banheira (205 respostas), as respostas foram muito variáveis, tendo sido registados 12 produtos distintos<sup>13</sup>, distribuindo-se por 31 conjugações diferentes. As constituições mais recorrentes foram sulfato de cobre de forma isolada (43,9%) e a combinação de sulfato de cobre com formol (16,1%). O sulfato de cobre constitui assim o princípio ativo mais frequentemente utilizado, fazendo mesmo parte da “receita” utilizada em 92,7% dos casos.

Tabela 3.14 – Finalidade da implementação do pedilúvio

Função	Explorações	
	Nº	%
Profilática	38	18,3
Terapêutica	40	19,2
Ambas	130	62,5
Total	208	100,0

As Tabelas 3.15 e 3.16 mostram, respetivamente, que a maioria dos pedilúvios utilizados tem apenas um compartimento (74,6%), sendo que cerca 60% dos pedilúvios utilizados têm um comprimento máximo de três metros.

Tabela 3.15 – Número de compartimentos do pedilúvio

Número de compartimentos	Explorações	
	Nº	%
1	147	74,6
2	43	21,8
3	7	3,6
Total	197	100,0

Tabela 3.16 – Comprimento total do pedilúvio

Comprimento (metros)	Explorações	
	Nº	%
[1,5; 3]	107	60,1
]3; 6]	66	37,1
]6; 10]	5	2,8
Total	178	100,0

<sup>13</sup> sulfato de cobre, sulfato de zinco, formol, oxitetraciclina, lixívia, água oxigenada, enxofre, cal, sal, ureia, vinagre e creolina.

A Tabela 3.17 demonstra que a percentagem de pedilúvios que tem o piso ondulado (55%) é ligeiramente superior à verificada para a superfície lisa (44%). A Tabela 3.18 indica que a maior fração destas infraestruturas se insere numa manga (59%), mas também existe uma quantidade considerável localizada à saída do ovil (38,5%).

Tabela 3.17 – Tipo de piso do pedilúvio (n=200)

Piso	Explorações	
	Nº	%
Liso	88	44,0
Ondulado	110	55,0
Esponjoso	2	1,0
<b>Total</b>	<b>200</b>	<b>100,0</b>

Tabela 3.18 – Localização do pedilúvio (n=200)

Localização	Explorações	
	Nº	%
Manga	118	59,0
Saída do ovil	77	38,5
Móvel	5	2,5
<b>Total</b>	<b>200</b>	<b>100,0</b>

### 3.3.6.2 – Vacinação

No que à vacinação diz respeito (81 respostas), a larguíssima maioria dos produtores (96,3%) utiliza a única vacina comercial disponível em Portugal (Footvax® - MSD Animal Health). Os restantes três produtores utilizam as vulgarmente designadas *Vacinas de Rebanho*, que são concebidas especificamente a partir de estirpes de *D. nodosus* isoladas no próprio efetivo.

Tal como se pode constatar no Gráfico 3.5, mais de metade das unidades pecuárias iniciaram o programa de vacinação nos cinco anos anteriores à realização do inquérito (53,1%). Ainda assim, o momento em que mais explorações começaram a vacinar ocorreu dez anos antes da implementação deste questionário (2007; 21%).

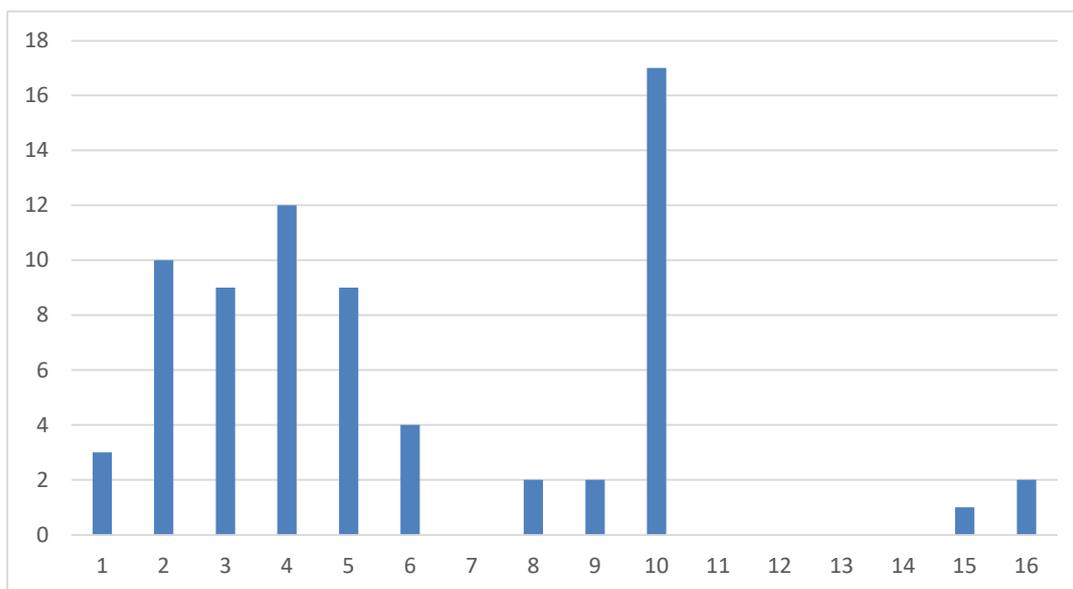


Gráfico 3.5 – Histograma revelando o período (em anos) desde que se iniciou o protocolo vacinal (nº absoluto; n=81)

Quanto à regularidade da vacinação, 67,9% dos produtores assumem vacinar todos os anos. Relativamente aos momentos de vacinação durante o ano, a maioria dos produtores adota uma estratégia de vacinar apenas num único momento (76,5%) (Tabela 3.19). As opções mais frequentes foram ambas de uma vacinação anual, nos meses de setembro (33,3%) e outubro (22,2%).

Tabela 3.19 – Frequência de vacinação ao longo de um ano

Frequência de vacinação	Explorações	
	Nº	%
Anual	62	76,5
Bianual	17	20,9
Triannual	1	1,2
Quadriannual	1	1,2
<b>Total</b>	<b>81</b>	<b>100,0</b>

### 3.3.6.3 – Análise multivariada

Tal como referido anteriormente, o processo de construção e calibração do modelo foi iniciado com um número elevado de variáveis, ao qual foi aplicada a já referida estratégia de eliminação regressiva, até que todas as variáveis independentes remanescentes apresentassem uma significância inferior a 0,1. A diferença nesta análise relaciona-se com a verificação de três classificações possíveis para a variável dependente, sendo elas as proporções residual (1), moderada (2) ou grave (3). Deste modo, só foram considerados para este modelo os registos referentes às 238 explorações que declaram ter peeira nos ovinos. Assim, o modelo final obtido integra três variáveis (Tabela 3.20).

Tabela 3.20 – Modelo multifatorial para as opções terapêuticas/preventivas (logit ordenado, n=238)

Variável dependente: Classes de peeira	Coefficiente	Erro padrão	Valor p
<b>Pedilúvio</b>	1,49378	0,414556	< 0,001
<b>AB tópica</b>	0,696460	0,423757	< 0,1
<b>Separação</b>	- 0,602953	0,313109	< 0,1
Casos corretamente preditos: 160 (67,8%)			
Critério Akaike = 345,1879		Critério Schwarz = 362,507	

Refira-se que as variáveis *Pedilúvio* e *Antibioterapia tópica* evidenciaram um valor positivo para o coeficiente, o que significa que estão positivamente associados com o aumento da proporção de animais clinicamente afetados por peeira. Em sentido inverso, a *Separação dos animais afetados* revelou um coeficiente negativo, o que significa que a mesma está associada com uma menor proporção de animais a exibir lesões.

### 3.4 – Discussão

Os resultados descritos nesta secção revelam inquestionável relevância por forma a melhor compreender o contexto epidemiológico da peira ovina na região Alentejo, particularmente no que diz respeito à identificação de potenciais fatores de risco associados à doença. Tanto quanto é do nosso conhecimento, este trabalho assume-se como uma das maiores inquirições já realizadas sobre qualquer doença animal, tendo por base a auscultação direta dos produtores de espécies pecuárias no Alentejo.

A recolha de dados foi feita através de entrevistas presenciais, o que tem como principal vantagem em relação ao envio de questionários, quer para o endereço postal quer para o correio eletrónico, a obtenção de uma taxa de resposta bastante superior (Dillman, 1991) e um contacto direto com o produtor que por vezes ajuda a ultrapassar eventuais dificuldades de perceção em algumas questões. Desta forma, alcançámos uma maior robustez nos resultados e minimizámos o risco de obtenção de uma amostra enviesada (Smith *et al.*, 2019). De facto, a utilização de dados recolhidos após envio de questionários está associada a uma menor taxa de resposta, o que pode potenciar a obtenção de uma amostra deturpada (Mann, 2003), já que será admissível que apenas “produtores mais satisfeitos” sintam a motivação e interesse suficientes para responder e devolver os referidos inquéritos.

A interpretação dos resultados obtidos nestes questionários está dependente da capacidade de diagnóstico por parte dos produtores inquiridos. Os trabalhos de validação desta questão, referenciados no Capítulo 2, revelam que será expectável que a maioria dos produtores de ovinos possui capacidade para identificar lesões de peira. A elevada taxa de diagnósticos corretos, revelada pelos *Inquéritos de Validação*, poderá ser justificada pela possibilidade de uma porção considerável dos produtores já ter contactado com esta doença ao longo da sua vida profissional, estando por isso familiarizados com as lesões por ela causadas. Esse contacto poderá ter decorrido, quer pela observação direta de úngulas de animais infetados, quer pela visualização de imagens dessas lesões. Refira-se que a hipótese de realizar o diagnóstico presencial em todas as explorações não correspondia a uma opção viável, devido a restrições económicas e de natureza logística.

Com o propósito de reduzir a possibilidade de diagnósticos incorretos, apresentámos previamente aos produtores imagens de lesões de peira, a fim de os elucidar sobre o aspeto macroscópico destas. Esta estratégia já havia sido aplicada por Kaler & Green (2008), por forma a garantir que os produtores estavam conscientes sobre qual a afeção a que se referia o questionário. Esta situação, aliada ao elevado número de inquéritos recolhidos e à validação já executada, deverá minimizar a ocorrência diagnósticos incorretos, garantindo a fiabilidade dos resultados.

Este ensaio reportou que 34,5 % das explorações de ovinos do Alentejo tiveram casos de peira nos seus animais durante o ano de 2016. Este valor não pode ser comparado diretamente com qualquer outro estudo nesta região, pois este é o primeiro trabalho do género feito em Portugal. Se compararmos a realidade alentejana com o valor encontrado na Suíça, notamos que não difere muito do reportado por Zingg *et al.* (2017), uma vez que aproximadamente 40 % dos rebanhos suíços tinham a doença. Porém, podemos verificar que a prevalência no Alentejo fica muito aquém dos valores de 86 e 90 % que foram obtidos no Reino Unido por Wassink *et al.* (2003) e Kaler & Green (2008), respetivamente.

O Alentejo regista um clima típico das regiões mediterrânicas, apresentando uma estação de verão particularmente seca (Carvalho, 2018). Como é sabido, as ilhas britânicas estão expostas a uma situação totalmente distinta, estando sujeitas a índices de precipitação anual muito elevados e períodos de pluviosidade dispersos ao longo de todo o ano (Green & George, 2008). Esta situação traduz-se numa acrescida dificuldade em definir de forma óbvia quais são os períodos de não transmissão da doença. De facto, como as estratégias de controlo da peira revelam maior eficácia durante a fase de não transmissão (Mills *et al.*, 2012), compreende-se porque é que no Reino Unido se registam prevalências da doença tão elevadas, já que a pluviosidade é registada de forma permanente ao longo de todo o ano.

A distribuição da prevalência da doença não ocorre de forma homogénea por todo o Alentejo, tendo os concelhos pertencentes ao distrito de Portalegre evidenciado o valor mais elevado entre as quatro sub-regiões do Alentejo, cifrando-se nos 46,4%. No extremo oposto encontramos o Alentejo Litoral, com a prevalência estimada a corresponder sensivelmente a metade da referida para a sub-região localizada mais a norte.

Os resultados deste estudo revelam que as explorações com efetivos superiores exibem maior probabilidade de ocorrência de doença, seguindo a mesma tendência dos trabalhos de Angell *et al.* (2018). Esta situação deve-se, presumivelmente, ao facto de ser mais difícil identificar e tratar os animais quando estes apresentam os primeiros indícios de claudicação (Wassink *et al.*, 2010b; Angell *et al.*, 2014). Para além deste motivo, também é expectável que as unidades com maiores efetivos sejam aquelas em que é necessário adquirir mais animais provenientes de fora do efetivo, para substituição e reposição do efetivo adulto (Green *et al.*, 2007a).

Por razões similares, também a área da exploração apresentou uma correlação positiva com o registo de peira. Contudo, esta tendência só se manifestou na análise univariada, uma vez que na modelação multifatorial esta variável não foi mantida no modelo final. Uma vez que se verifica uma forte correlação positiva entre as variáveis *Efetivo* e *Área da exploração* (coeficiente de correlação de Pearson ( $|r|$ ) = 0,62; valor  $p < 0,001$ ), daí que só uma delas conste do referido modelo.

Os resultados evidenciam que as explorações em que há coabitação de animais da espécie ovina e bovina exibiram maior frequência de afeção por peeira ovina. Esta tendência deve-se à possibilidade de as úngulas dos bovinos poderem ser reservatórios para algumas estirpes benignas *D. nodosus* (Raadsma & Egerton, 2013). No caso dos caprinos, apesar de também estar relatada a possibilidade de transmissão de estirpes virulentas de *D. nodosus* para a espécie ovina (Ghimire *et al.*, 1999), não foi possível encontrar evidência estatística que indique que a coabitação com caprinos seja um potencial fator de risco no Alentejo. Esta situação estará provavelmente relacionada com a relativamente baixa proporção de produtores que têm caprinos a coabitar com a espécie ovina (22,7%). Outra justificação plausível pode estar relacionada com a hipótese de no Alentejo não ser reportada uma alta prevalência dessas estirpes de *D. nodosus* que são normalmente partilhadas por ovinos e caprinos. Tal assunto poderá ser merecedor de análise detalhada no futuro, por forma a esclarecer esta questão.

Outro dos potenciais fatores de risco identificado foi o regime de estabulação dos animais, tal como já havia sido evidenciado por Kaler & Green (2009). Uma das justificações para tal pode decorrer do facto de, durante os períodos de estabulação, os animais estarem sujeitos a uma densidade animal elevada, possibilitando o seu contacto com um ambiente em que potencialmente esteja presente uma maior carga bacteriana do agente *D. nodosus* (Angell *et al.*, 2018). Outra das razões que levam a que a estabulação animal seja considerada um fator de risco para a ocorrência de peeira poderá estar relacionada com o facto de o material mais frequentemente utilizado nas camas ser a palha. Este tipo de matéria prima vai ficando gradualmente mais conspurcado, à medida que vai estando em contacto com os excrementos animais, gerando um microambiente mais quente e húmido. Ora, tais condições revelam-se essenciais para a proliferação bacteriana do agente etiológico da doença (Abbott & Lewis, 2005). Recorde-se que apenas 3,2% dos inquiridos no nosso trabalho afirmaram proceder à mudança de camas de modo regular, situação que irá necessariamente agravar a transmissão de *D. nodosus* entre animais, graças à capacidade de sobrevivência da bactéria fora do hospedeiro (Myers *et al.*, 2007; Muzafar *et al.*, 2016).

O facto de existirem épocas de cobrição, e naturalmente dos respetivos partos, bem definidas também se revelou potencialmente problemática para a existência de casos de peeira nas explorações. Nas unidades que utilizam este tipo de manejo sucede uma situação idêntica à reportada no caso do regime de estabulação, uma vez que durante as épocas de parto as ovelhas e os borregos estão concentrados e, em consequência, ficam submetidos a uma superior densidade populacional, contactando com um ambiente mais sujeito a contaminação (Wassink *et al.*, 2003; Green & George, 2008; Angell *et al.*, 2018), fator que favorece a transmissão da doença entre animais e amplifica a possibilidade de contágio (Raadsma & Egerton, 2013).

A participação dos animais em feiras e/ou mercados também constitui relevante fator de risco, devido ao contacto com ovinos oriundos de diversas proveniências. O eventual contacto com animais portadores de quaisquer estirpes de *D. nodosus* que não existam na exploração de origem pode permitir a entrada da doença em unidades pecuárias que até à data poderiam não ter qualquer caso. Desta forma, as medidas de biossegurança são um dos principais pontos críticos no que se refere à prevenção da introdução deste tipo de doenças contagiosas nas explorações (Angell *et al.*, 2014; Green & Clifton, 2017).

A existência de áreas de montado nas zonas de permanência dos ovinos também se revelou como hipotético fator de risco, tanto na análise univariada como na multifatorial. No caso do montado alentejano, ecossistema característico do clima mediterrânico (Rosário *et al.*, 2019), não existe qualquer trabalho com o qual possamos comparar diretamente os resultados obtidos em relação à ocorrência de peeira em ovinos. Ainda assim, o facto de a existência de montado ser estimada como potencial fator de risco poderá ser difícil de justificar, pois o sistema da produção de ovinos usual nas áreas do montado alentejano é extensivo, com uma reduzida densidade animal (entre 0,15 e 1 Cabeças Normais por ha para espécies ruminantes, equivalente a um encabeçamento entre 1 e 6,7 ovinos por ha) (Pinto-Correia *et al.*, 2013). Deste modo, a lógica sugere que os baixos encabeçamentos não deveriam potenciar a expressão da peeira, uma vez que os são as elevadas densidades populacionais que constituem um fator de risco (Kaler & Green, 2009). Todavia, o contexto alentejano na época estival costuma ser bastante peculiar, uma vez que a sombra de algumas árvores, como sobreiros ou azinheiras, é usada pelos animais como locais de aglomeração (Figura 3.1).



Figura 3.1 – Comportamento de agregação dos ovinos no montado alentejano durante os meses de Verão (fotografia original)

Nestes locais, a densidade é bastante elevada, podendo assim projetar um acrescido risco de transmissão entre animais. Mais, a maioria dos solos existentes nas áreas de montado tem uma superior capacidade de retenção de água (Pinto-Correia *et al.*, 2013), o que proporcionará um microambiente húmido às úngulas dos animais. Esta situação poderá ser suficiente para predispor à ocorrência de alterações físicas no estrato córneo do casco (Angell *et al.*, 2018) e de mudanças biológicas na microflora presente (Raadsma & Egerton, 2013), constituindo ambos pré-requisitos para o desenvolvimento da doença (Green & George, 2008; Raadsma & Egerton, 2013). Ainda assim, é preciso prudência aquando da interpretação destes dados, uma vez que se regista uma correlação positiva significativa entre a presença de montado e a área das explorações e também com a dimensão do efetivo (ambos com valor  $p < 0,001$ ). Como já vimos, estes dois fatores também já foram identificados como potenciais fatores de risco, pelo que o efeito desta variável poderá estar a ser influenciada pelas restantes. Deste modo, torna-se imperativo aprofundar esta análise antes de tecer conclusões definitivas sobre o papel do montado na patogénese da peeira. Seria eventualmente interessante realizar um ensaio, através da recolha de amostras de solo nesses locais de aglomeração dos ovinos, que avaliasse as condições de sobrevivência do agente etiológico nessas circunstâncias.

Os atributos *má capacidade de drenagem dos terrenos e baixa altitude das áreas de permanência dos ovinos* também se revelaram ambos como potenciais fatores de risco. Porém, é necessário interpretar estes resultados com cautela, uma vez que ambas as questões envolvem uma resposta subjetiva, tendo alguns produtores revelado dificuldade em responder com precisão a estes aspetos. Ainda assim, os resultados obtidos têm respaldo lógico, visto que, quer as áreas de baixa altitude quer os terrenos com fraca capacidade de drenagem registam uma maior probabilidade de alagamento, e conseqüentemente um superior teor de humidade. O facto de os animais pisotearem recorrentemente esse terreno enlameado e húmido induz a uma constante maceração do estrato córneo das úngulas, favorecendo a colonização da bactéria *Dichelobacter nodosus*, como de forma expressiva a literatura empírica tem reconhecido (Green & George, 2008; Raadsma & Egerton, 2013; Atia *et al.*, 2017).

Para as restantes variáveis analisadas não foi possível encontrar correlação estatística com a presença de doença nas unidades pecuárias, sendo que para algumas isso sucedeu de forma algo surpreendente. Na comparação entre as diferentes raças de ovinos, não foi possível identificar diferenças estatisticamente significativas entre as múltiplas raças que as indicassem como mais suscetíveis do que outras. Este facto parece não estar conforme a predisposição racial reportada por Emery *et al.* (1984), que referem que animais pertencentes à raça merina são mais suscetíveis à infeção por peeira do que os ovinos *suffolk*. No nosso estudo não foi possível retirar qualquer conclusão neste sentido uma vez que a maioria das explorações (85,4%) possuem animais gerados a partir do cruzamento de diferentes raças, o que inviabiliza uma correta análise deste parâmetro.

No caso da variável *textura dos solos*, também não se identificou qualquer correlação estatística entre ela e a variável dependente, apesar de Muzafar *et al.* (2016) terem descoberto que os solos do tipo argiloso são os que mais favorecem a sobrevivência do agente *D. nodosus*. Porém, tal como já havia sido reportado em outras variáveis, esta questão envolve uma resposta algo subjetiva e alguns produtores tiveram uma certa dificuldade em responder de forma precisa, referindo a heterogeneidade de texturas existentes no seu território. Ainda assim, o valor p obtido (0,069) encontra-se bastante perto do limiar de rejeição (0,05), pelo que no limite também este poderia ser assinalado como um fator de risco.

O pastoreio em áreas de regadio confere condições ideais para a transmissão da doença (Graham & Egerton, 1968), uma vez que essas pastagens melhoradas habitualmente são altas e densas, tendo por isso uma superior capacidade de retenção de humidade, desenvolvendo um *efeito-esponja* (Angell *et al.*, 2018), o que propicia ao desenvolvimento da doença (Raadsma & Egerton, 2013). Ainda assim, a nossa pesquisa não identificou que o pastoreio em áreas de regadio pudesse constituir um potencial fator de risco, eventualmente porque a proporção de produtores de ovinos que utiliza o regadio é relativamente reduzida (12,4%).

A partilha de caminhos e pastagens com efetivos de outras explorações, bem como a aquisição de animais de substituição em outros efetivos (com estatuto sanitário para a peira desconhecido) constituem óbvias medidas de biossegurança que devem ser evitadas por forma a reduzir a prevalência de casos clínicos, ou mesmo para evitar a entrada da doença em explorações livres de peira (Winter *et al.*, 2015; Green & Clifton, 2017). Ainda assim, na amostra do nosso estudo não foi possível identificar evidência estatística que sugira que estes dois fatores constituam potenciais fatores de risco.

A locomoção dos ovinos em solos pedregosos exerce um efeito abrasivo para os dígitos dos animais, o que mais facilmente provocará lesões no espaço interdígital, fomentando assim o risco de colonização bacteriana, conforme Angell *et al.* (2018) reconheceram. Desta forma, seria expectável que a existência de pedras nas zonas de pastoreio animal que provocassem lesões nas suas úngulas fosse atestado como um fator de risco, mas os resultados obtidos não o confirmaram. Mais uma vez, como se trata de uma resposta que envolve alguma subjetividade por parte do respondente, temos de ser cautelosos aquando da interpretação dos resultados.

Analisando agora os meses em que foram observadas ovelhas com sintomatologia típica da doença no ano 2016, observa-se uma clara tendência para que os registos de ocorrência de casos clínicos no Alentejo ocorram fundamentalmente nos períodos da Primavera e Inverno. Esta forte variação sazonal já havia sido reportada por Abbott & Lewis (2005) num estudo desenvolvido na Austrália, onde foi detetada uma correlação direta entre a incidência da doença e os níveis de pluviosidade registados. Apesar da enorme distância geográfica que separa as duas regiões, as quais estão nos antípodas

no plano mundial, as condições climáticas predominantes naquele país são tipicamente as verificáveis no espaço mediterrânico (Lamont & He, 2017), o que fundamenta a ocorrência do mesmo padrão de distribuição de casos clínicos durante o ano. Esta tendência é totalmente distinta da verificada no Reino Unido (Angell *et al.*, 2014; Angell *et al.*, 2018), uma vez que a precipitação nesta região se distribui de forma muito mais homogénea ao longo do ano, não estando definida com rigor uma estação seca, pelo que se podem observar lesões típicas de peeira ao longo de todo o ano.

A forma utilizada para a identificação de ações terapêuticas e preventivas que podem constituir fatores protetores ou de risco para a ocorrência de peeira nas unidades poderá não se revelar inteiramente eficaz. De facto, os dados recolhidos foram obtidos com base num estudo transversal, pelo que nestes casos não é possível o seu uso para determinar inferências causais entre os fatores de risco e a sua resposta (Mann, 2003), não sendo possível afiançar com rigor qual a efetiva interação causa-efeito nas associações identificadas.

As frequências de aplicação dos nove fatores avaliados foram invariavelmente superiores nas unidades que têm peeira, em comparação com as que não reportaram casos de doença. Assim, a hipótese mais provável será aquela de que grande parte dos produtores tenha começado a adotar estas medidas após o problema ser detetado na exploração, ao invés de se apostar na prevenção para que os seus animais não fiquem expostos à doença. Desta forma, uma alternativa à utilização de estudos transversais seria a implementação de um estudo longitudinal devidamente estruturado para o efeito (Green *et al.*, 2007b), visto que essa seria a opção mais fidedigna para determinar quais os procedimentos que constituiriam efetivos fatores de risco para a doença.

Ao considerarmos exclusivamente as respostas referentes às explorações em que foram relatados casos de peeira, utilizámos o modelo *logit ordenado*, por via do qual pudemos comparar os diferentes níveis de severidade da doença (residual, moderada e grave). Existia a possibilidade de inquirir os produtores sobre a proporção exata de animais que estariam afetados ao longo do ano anterior, tal como foi realizado no estudo de Kaler & Green (2009), mas os resultados obtidos pelas autoras mostraram que esta prática, aparentemente mais fidedigna, motivou da parte dos produtores uma menor capacidade de responder com precisão, comparativamente com a estratégia seguida por Wassink *et al.* (2003), na qual as respostas dos produtores foram transformadas numa variável categórica ordinal.

Do conjunto das nove variáveis analisadas, apenas três evidenciaram correlação estatisticamente significativa face ao grau de severidade da doença na exploração. Das duas, a *utilização do pedilúvio* e a *antibioterapia tópica*, registaram um coeficiente de correlação positivo, o que significa que quanto maior a utilização desta técnica, maior será a proporção de ovinos afetados por peeira.

No caso do pedilúvio, é uma realidade que têm sido reconhecidos os seus potenciais benefícios para a prevenção da disseminação da doença nos seus estágios iniciais (Winter *et al.*, 2015), quando os desinfetantes utilizados têm a capacidade de inativar as bactérias presentes nos dígitos dos ovinos e de reduzir a contaminação ambiental (Green & Clifton, 2017). Contudo, é reconhecido que os pré-requisitos exigidos inviabilizam a sua correta utilização na grande maioria das explorações comerciais. Num estudo executado no Reino Unido concluiu-se que apenas os produtores que dispõem de excelentes condições para a execução do pedilúvio assinalaram reduções significativas nos índices de peeira (Kaler & Green, 2009).

No Alentejo, o que se verifica invariavelmente é que as condições dos pedilúvios se encontram longe de serem as ideais. As banheiras que são utilizadas têm um comprimento que fica muito aquém do mínimo desejável (97,2% delas têm um comprimento inferior ou igual a seis metros), o que determina que o tempo de contacto com os princípios ativos seja muito curto, ficando muito aquém dos 2-30 minutos recomendados, dependendo dos produtos que sejam utilizados (Winter, 2004). Em algumas unidades pecuárias é utilizada uma composição algo arbitrária aquando da preparação do pedilúvio, sendo utilizados alguns produtos para os quais não existem evidências científicas que atestem a sua eficiência na prevenção ou no tratamento da doença (ex: sal, lixívia, vinagre, enxofre, cal ou creolina). Para além disto, a maioria dos pedilúvios possuem somente um compartimento (74,6%), pelo que nesses casos não haverá passagem prévia por qualquer lava-pés, levando à rápida conspurcação da solução depositada no interior da banheira. Nestas situações seria necessário realizar com bastante frequência o descarte e subsequente reposição dos constituintes da solução usada no pedilúvio, algo que não ocorre de forma recorrente. Deste modo, o que parece acontecer é que este procedimento vai obrigar os animais a estarem em contacto com uma solução contendo um *pool* bacteriano, o que vai facilitar a disseminação do agente etiológico entre animais, culminando numa ação contrária ao que seria expectável e desejável.

Na aplicação tópica de antimicrobianos, estamos a referir-nos a uma situação inteiramente diferente da anterior, sendo também distinta a sua interpretação. A aplicação de antibióticos no tratamento de peeira está associada a rápidas e eficientes taxas de recuperação (Green & George, 2008), sendo que até à data praticamente não há relatos de resistências aos fármacos antimicrobianos para as bactérias envolvidas (Green & Clifton, 2017). Assim, não seria lógico que a antibioterapia tópica constituísse um fator de risco. Contudo, existe no Alentejo uma convicção algo vulgarizada de que a antibioterapia tópica, na forma de pulverizado (vulgarmente conhecido por “*spray azul*”), confere uma ação muito eficiente (o que leva a usuais referências de que o produto é “milagroso”). Assim, muitos produtores não sentem necessidade de usar outra técnica alternativa ou suplementar. Desta forma, as restantes medidas complementares acabam por ser descuradas, sobretudo a concomitante administração

de antibacterianos por via sistémica. De facto, existe uma diferença bastante significativa nas explorações que têm a doença (valor  $p < 0,001$ ) quando comparamos a fração que usa a antibioterapia tópica (84,9%) e sistémica (61,9%).

Se nos focarmos apenas nas explorações que registaram uma proporção de ovinos afetados inserida na classe superior ( $> 30\%$ ;  $n=10$ ) verificamos que em todas elas há aplicação de antibiótico localmente, mas apenas numa delas é utilizado simultaneamente o antibiótico sistémico. Esta diferença entre a aplicação de antibioterapia tópica e sistémica é preocupante uma vez que apenas a última tem capacidade de atingir as bactérias anaeróbias alojadas profundamente no interior das úngulas (Green & George, 2008). Adicionalmente, os antibióticos injetáveis conseguem manter-se em concentrações superiores aos níveis terapêuticos durante um longo período, mesmo que sejam apenas utilizadas numa administração única (Strobel *et al.*, 2014). Esta medida está associada a uma redução significativa na percentagem de animais com sinais clínicos, desde que os animais sejam tratados nos primeiros três dias após evidenciarem claudicação (Prosser *et al.*, 2019; Best *et al.*, 2020). Tendo em conta que a análise multivariada permite analisar apenas o efeito de uma variável de cada vez, mantendo as restantes constantes (Chamberlain, 1982), podemos assumir que o facto de utilização da antibioterapia tópica se ter revelado como um fator de risco deve-se à incapacidade de controlar a doença dentro das explorações, caso seja utilizada de forma isolada. De qualquer forma, esta questão só poderá ser esclarecida se for realizado um estudo longitudinal que permita aferir o sentido das relações causa-efeito entre as variáveis em causa (Mann, 2003).

A *separação dos animais afetados* dos restantes ovinos do rebanho consiste na única variável analisada que evidenciou significância estatística com um coeficiente negativo. Daqui infere-se que as explorações em que ocorre separação dos animais com sinais clínicos de peira têm tendência a apresentar uma menor proporção de ovinos afetados, constituindo a separação um fator protetor. Naturalmente que esta conclusão expressa um corolário lógico e previsível, estando de acordo com o padrão identificado nas pesquisas de Green & Clifton (2017) e Zingg *et al.* (2017). Assim, podemos admitir que esta medida corresponde a um efetivo fator protetor para minimizar a expressão em níveis mais controlados em cada rebanho de ovinos em que ocorrem casos de peira.

A utilização do corte corretivo das úngulas como forma de tratamento de peira tem sido prática usual nas explorações de ovinos ao longo de várias décadas, contudo sabe-se agora que tais práticas estão associadas a maiores índices de prevalência e incidência da mesma (Bennett & Hickford, 2011; Green & Clifton, 2017), desaconselhando-se assim o seu uso. No nosso estudo, os resultados não identificaram qualquer relação estatisticamente significativa entre a prática da correção podal e as proporções de animais afetados. Isto deve-se ao facto de a grande maioria das unidades com peira (87,4%) adotarem esta medida como forma de prevenção e/ou tratamento, o que torna

difícil identificar diferenças entre as três classes de severidade. Este elevado valor é mesmo preocupante, já que segue o oposto do sugerido pelas mais recentes indicações científicas (Green *et al.*, 2007b; Green & Clifton, 2017). Este valor registado no Alentejo é ainda superior ao registado em 2004 em unidades no Reino Unido, em que 76% dos agricultores realizavam sessões de corte corretivo de úngulas de modo rotineiro (Kaler & Green, 2009). Contudo, este valor tem vindo a reduzir paulatinamente nesse país, tal como pode ser comprovado pelos valores de 40% em 2013 (Winter *et al.*, 2015), 21% em 2015 (Prosser *et al.*, 2019) e de 20% em 2019 (Best *et al.*, 2020).

Em Portugal ainda há necessidade de desenvolver ações de extensão e de sensibilização junto dos produtores para mudar as suas práticas, devendo os mesmos ser alertados sobre as vantagens que adviriam da interrupção da *podiatría terapéutica*, com benefícios económicos para a exploração, gestão de tempo dos funcionários e bem-estar animal (Winter & Green, 2017). Mesmo em explorações onde não foi detetada a doença, mas que realizam algum tipo de prevenção, uma proporção superior a 70% realiza habitualmente sessões de podiatría, o que confirma que é mesmo prática corrente com profundas raízes culturais. Uma das causas empiricamente atribuída à dificuldade em abolir este tipo de procedimentos, apesar das evidências científicas sugerirem o oposto, tem sido a idade elevada de muitos agricultores do Alentejo que ainda se mantêm no ativo. Contudo, uma indicação que poderia ser preocupante para suportar esta teoria foi registado por Best *et al.* (2020). Os trabalhos dos autores identificaram que os produtores mais jovens, com idade inferior a 35 anos, são quem mais realiza sessões de podiatría. Contudo, notou-se que os dados recolhidos nesse estudo sofreram um enviesamento em prol dos respondentes com menor idade, uma vez que os questionários foram distribuídos em formato digital, existindo uma tendência para os indivíduos mais jovens apresentarem uma maior facilidade de acesso a inquéritos distribuídos nesse tipo de formato (Díaz *et al.*, 2018).

A proporção de produtores que têm a doença e que vacinam o seu efetivo especificamente para peeira foi de 11,8%, valor relativamente baixo para que pudesse ser identificada qualquer correlação estatística entre a implementação da vacinação e a proporção de ovinos afetados. Este valor não dista muito do registado em 2013 nas ilhas britânicas (16%) (Winter *et al.*, 2015), se bem que desde então o número de produtores que iniciou o programa vacinal tem vindo a aumentar sustentadamente. Em 2015, 29% das unidades pecuárias já reportavam ter um protocolo vacinal em curso (Prosser *et al.*, 2019), sendo que em 2019 se atingiram os 36% (Best *et al.*, 2020). Nesse último trabalho foi mesmo possível associar uma correlação entre o uso da vacina *Footvax*<sup>®</sup> há mais de cinco anos e a obtenção de uma redução efetiva na prevalência de claudicação global nos efetivos ovinos.

No caso dos dados recolhidos no Alentejo, entre os 81 produtores que vacinam os seus efetivos para a peeira, apenas 34,6% cumprem o critério de já terem começado a vacinar

há mais de cinco anos. Possivelmente, o baixo número de produtores que realiza a vacinação poderá estar relacionado com o facto descrito por Best *et al.* (2020), já que esses trabalhos apontam para o facto de os produtores consideram a vacina como uma ferramenta de reação ao problema. Deste modo, no Reino Unido a vacina não tem sido habitualmente utilizada como uma medida preventiva, só sendo considerada a hipótese de iniciar um protocolo vacinal como resposta ao aumento do valor percentual de ovinos com claudicação. Apesar de não termos dados concretos que sustentem esta hipótese, acreditamos que uma situação idêntica seja a que está a ser verificada no Alentejo.

Medidas como a quarentena (nos animais adquiridos ou que tenham regressado à exploração), a mudança das camas com regularidade ou a aplicação de produtos com propriedades desinfetantes (que reduzam a carga microbiana) nas camas são descritas como de extrema importância no controlo da doença (Cheetham *et al.*, 2006; Dhungyel *et al.*, 2008; Bennett *et al.*, 2011). Porém, o número reduzido de produtores que afirma implementar estas medidas de biossegurança mostra que estas são práticas implementadas apenas de forma esporádica no Alentejo, o que inviabiliza a verificação de correlação estatística desta prática com a severidade da doença. Aliás, o escasso número de produtores que afirma realizar a quarentena (0,3%) é um dado alarmante, já que esta medida é considerada vital para a redução do risco de peera e, adicionalmente, de outras doenças infecciosas (Green & Clifton, 2017). No Reino Unido tem havido uma consciencialização da preponderância que esta medida tem no desempenho produtivo da exploração, uma vez que em 2013 apenas 13% das explorações implementavam a quarentena nos animais adquiridos fora da exploração (Winter *et al.*, 2015), valor esse que subiu exponencialmente passados seis anos (72,6%) (Best *et al.*, 2020). Ora, pelos dados recolhidos, cremos que os produtores de ovinos do Alentejo não estão devidamente sensibilizados para a importância crucial desta medida profilática, a qual seria de fácil aplicação e com reduzidos custos económicos. De resto, uma análise custo-benefício a esta prática seguramente demonstraria a sua utilidade para a rentabilidade das unidades agropecuárias, sendo que a apresentação de dados económicos concretos aumentaria a eficiência das ações de sensibilização.

### **3.5 – Conclusão**

O presente trabalho constitui o primeiro estudo epidemiológico sobre peera no Alentejo e demonstrou de forma inequívoca que determinados fatores estão diretamente associados com uma superior possibilidade de existir a doença nos efetivos ovinos. Alguns dos fatores de risco identificados estão relacionados com as formas de manejo praticadas em cada exploração, se bem que o ambiente físico e climático em que ela está inserida também desempenhe um papel fundamental.

Para confirmar de forma indelével qual a verdadeira sequência causa-efeito seria recomendável a elaboração de estudos longitudinais, tal como um estudo prospetivo de coorte (Mann, 2003), o que permitiria confirmar quais desses fatores constituem verdadeiros fatores de risco para o surgimento e desenvolvimento da peeira. Esta situação torna-se particularmente relevante para averiguar de forma inequívoca qual o real impacto das estratégias preventivas e terapêuticas na observação de casos de peeira nas explorações.

Todavia, os resultados obtidos no presente estudo alertam para a imperatividade de reforçar as ações de divulgação sobre esta temática junto dos produtores e dos médicos veterinários assistentes, uma vez que se confirmou que muitos dos procedimentos implementados são totalmente desadequados para os propósitos a atingir, acabando por ter um efeito nefasto e contraproducente no combate eficaz contra a doença.

## **Capítulo 4 – Caracterização bioclimática e análise de agregados espaciais da peeira no Alentejo**

### **4.1 – Introdução**

A bactéria *D. nodosus* é o agente responsável pela ocorrência de peeira em ovinos e em outras espécies ruminantes (Bennett & Hickford, 2011; Allworth, 2014). Porém, a colonização do espaço interdigital das úngulas de ovinos saudáveis por parte deste agente não será, por si só, suficiente para o desenvolvimento de doença clínica (Kennan *et al.*, 2011), necessitando de contextos edafoclimáticos específicos que forneçam alguns requisitos propícios ao seu desenvolvimento. Tem sido assumido que as bactérias envolvidas neste processo só dispõem de capacidade para se multiplicarem caso disponham de certas condições ambientais e de solos favoráveis (Green & George, 2008; Raadsma & Egerton, 2013). Assim, este capítulo foca-se no estudo destes aspetos e na sua influência sobre aquela doença. Para isso, serão tidos em conta os elementos que no plano climático e de solos caracterizam a localização das explorações pecuárias que são objeto da pesquisa.

Perante as evidências empíricas encontradas, determinados fatores climáticos, entre os quais se destacam a pluviosidade e a temperatura ambiente, têm-se revelado cruciais para a patogénese da doença. No que diz respeito concretamente à influência do regime pluviométrico no ciclo de expressão da doença, tem sido verificado que a propensão à sua transmissão é maximizada nos períodos chuvosos e húmidos, sendo considerado que a partir de um valor de precipitação mensal de 50 mm/m<sup>2</sup> tais condições são potenciadas (Abbott & Lewis, 2005). A transmissão do agente é ainda favorecida nos períodos de chuva persistente, que se prolongam durante pelo menos seis semanas, ao invés do que acontece com os episódios de chuva intensa e mesmo torrencial que ocorram em períodos temporais curtos e concentrados (Graham & Egerton, 1968). O ambiente húmido contribuirá assim para aumentar a suscetibilidade do hospedeiro à doença, não só através da indução de alterações físicas na úngula, como é o caso da dermatite interdigital, mas também pelos efeitos que produz na alteração da composição da flora microbiana presente, facilitando o processo de colonização (Green & George, 2008; Raadsma & Egerton, 2013).

No que concerne ao outro fator meteorológico, a temperatura, tem vindo a ser demonstrado que a existência de valores ambientais reduzidos, especificamente quando apresentam registos inferiores a 10°C, contribuem para diminuir a capacidade de disseminação do agente da peeira (Ghimire & Egerton, 1996; Abbott & Lewis, 2005). Ainda assim, Muzafar *et al.* (2016) reconheceram que existem evidências de que

bactéria *D. nodosus* possui capacidade de sobrevivência mesmo quando confrontada com temperaturas que rondem os 5°C.

Centrando-nos agora nos fatores relacionados com o tipo de solo, verifica-se que algumas categorias desempenham um papel bastante relevante na epidemiologia da peeira, como é o caso dos solos do tipo argiloso, que possuem menos porosidade e, logo, registam uma menor capacidade de drenagem (Muzafar *et al.*, 2016). Esta situação leva a que durante os períodos chuvosos, o terreno esteja permanentemente alagado, o que provoca uma constante maceração do estrato córneo das úngulas sempre que os ovinos pisoteiem esses terrenos. Tal situação favorecerá a colonização do espaço interdigital por parte das bactérias envolvidas no curso da peeira (Green & George, 2008; Raadsma & Egerton, 2013).

Evidentemente que o efeito que os fatores referidos têm na patogenia da doença está bastante dependente das especificidades edafoclimáticas registadas em cada região geográfica, sendo de assinalar que para o Alentejo, tanto quanto é do nosso conhecimento, ainda não foi efetuada qualquer avaliação nesse sentido. Esta região corresponde a um território com uma área aproximada de 27330 ha, onde predominam as vastas planícies que são usadas para atividades agrícolas e pecuárias, grande parte delas em regime extensivo (INE, 2019). Em termos climatológicos e de acordo com a classificação *Köppen-Geiger* (Köppen, 1931), que é amplamente utilizada pelo Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA), a quase totalidade da superfície alentejana enquadra-se na categoria *clima temperado com verão quente e seco* (Rocha *et al.*, 2020). Existe ainda uma faixa costeira no Alentejo Litoral que é englobada na classe *clima temperado com verão quente e suave*, ficando a categoria *clima árido de estepe fria da latitude média* circunscrita a uma reduzida franja territorial no Baixo Alentejo.

Em síntese, a região do Alentejo caracteriza-se tradicionalmente por uma reduzida disponibilidade de água proveniente da precipitação atmosférica direta, principalmente nos anos em que o Verão se apresenta mais quente e seco. Outra característica marcante deste tipo de clima é que os períodos de pluviosidade mais intensa acontecem durante as estações invernosas, onde as temperaturas são mais baixas. Não obstante a escassez de água constituir um fator limitante para a atividade agrícola e pecuária na região em causa, esta situação tem vindo a ser um pouco minorada desde a entrada em funcionamento pleno da barragem do Alqueva no início deste milénio. Esta infraestrutura hidráulica permitiu construir o maior lago artificial da Europa ocidental, apresentando uma capacidade reservatória máxima de 3.150.000.000 m<sup>3</sup> (Fraga *et al.*, 2020), facto que bastante contribuiu para melhorar a capacidade de irrigação dos terrenos das áreas contíguas e, naturalmente, propiciou o desenvolvimento de uma agricultura mais intensiva (Fraga & Santos, 2018; Fraga *et al.*, 2020).

Neste capítulo, é nosso propósito estudar o tipo e a intensidade da interação existente entre a probabilidade de ocorrência de casos de peeira nas explorações de ovinos do

Alentejo e as dinâmicas nas variáveis relacionadas com os aspetos climatológicos e com as tipologias de solos onde as atividades pecuárias se desenvolvem. Para tal serão considerados os registos disponibilizados em diversas plataformas que compilam dados referentes a uma multiplicidade de biovariáveis climáticas, para períodos temporais alargados, e também às taxonomias de solos existentes nas explorações estudadas. No tratamento dos dados foram aplicadas diversas ferramentas de estatística espacial, as quais permitiram construir mapas de risco de existência da doença, baseados em modelos de determinação de probabilidades. Procedeu-se ainda a uma análise de agregação de dados espaciais, por via da qual foram identificados os *clusters* territoriais com maior prevalência de peeira no Alentejo.

## **4.2 – Metodologia**

### **4.2.1 – Georreferenciação das explorações da amostra**

No processo de implementação da nossa pesquisa, utilizámos as respostas dos 689 *Inquéritos Epidemiológicos* que foram alvo de estudo detalhado no Capítulo 3. Uma vez que não dispúnhamos de qualquer tipo de informação sobre a localização efetiva de cada exploração, solicitámos à Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV), que é a autoridade nacional de regulação da saúde animal, que nos facultasse as coordenadas geográficas das mesmas. Entre a totalidade das explorações pecuárias em que requeremos a georreferenciação, aquela entidade disponibilizou-nos as coordenadas dos centroides de 645 delas. Para os 44 casos remanescentes não foi possível obter uma localização validada. Em alguns dos casos, tal situação deveu-se à existência de erros tipográficos no registo da marca de exploração, enquanto nos casos remanescentes a exploração já não se encontrava ativa na data de disponibilização dos dados.

### **4.2.2 – Obtenção de dados bioclimáticos**

No que respeita à análise climática, privilegiámos o uso dos dados disponíveis no *dataset WorldClim 2.0*. As biovariáveis (*B01-B19*) disponíveis nesta base de dados permitem caracterizar cada localização a nível climático, uma vez que os dados fornecidos resultam das observações de precipitação e temperatura recolhidas entre os anos 1970 e 2000. Os valores foram obtidos através do cruzamento das leituras realizadas em milhares de estações meteorológicas a nível mundial, através de medições efetuadas por satélite (Fick & Hijmans, 2017). Algumas biovariáveis representam tendências anuais, enquanto outras referem-se à sazonalidade e, algumas delas, dizem respeito a fatores ambientais extremos. Das 19 biovariáveis disponibilizadas na *WorldClim*, optámos por focalizar a análise em 14 delas, sendo que metade das variáveis respeitam

à caracterização da temperatura ambiente, enquanto a outra metade está diretamente relacionada com a precipitação. A designação das 14 biovariáveis consideradas encontra-se exposta na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Designação das 14 variáveis bioclimáticas consideradas (WorldClim 2.0)

Temperatura (°C)		Precipitação (mm/m <sup>2</sup> )	
B01	Temperatura anual média	B12	Precipitação anual
B05	Temperatura máxima no mês mais quente	B13	Precipitação no mês mais húmido
B06	Temperatura mínima no mês mais frio	B14	Precipitação no mês mais seco
B08	Temperatura média no trimestre mais húmido	B16	Precipitação no trimestre mais húmido
B09	Temperatura média no trimestre mais seco	B17	Precipitação no trimestre mais seco
B10	Temperatura média no trimestre mais quente	B18	Precipitação no trimestre mais quente
B11	Temperatura média no trimestre mais frio	B19	Precipitação no trimestre mais frio

Procedemos então à extração dos dados, com base em técnicas de geoprocessamento, a partir de imagens *GeoTIFF*. O formato destes ficheiros *raster* incluem os dados de georreferenciação no sistema de coordenadas WGS-84 (EPSG: 4326), com uma resolução espacial de 30 arco-segundos (aproximadamente 1 km x 1 km). Esta resolução espacial é bastante elevada, sendo adequada para obter uma sensibilidade elevada, algo que poderá não ocorrer com menores níveis de resolução (Joka *et al.*, 2019). Optámos por não realizar a extração dos dados exclusivamente no centroide da exploração, uma vez que isso acarretaria eventuais erros, pois a caracterização bioclimática nas explorações não se distribui de forma homogénea ao longo de toda a extensão da herdade. Assim, decidimos considerar que a área de extração corresponderia à área circular, em que o centroide da exploração corresponde ao centro da circunferência, com área de 240,9 ha (raio aproximado de 876 m), por corresponder à área média das explorações inquiridas. Este procedimento permite minimizar o erro associado à recolha de informações num único ponto, tal como recomendado por Hradilová *et al.* (2019). Deste modo é possível atenuar a incerteza causada pelo facto de não conhecermos os limites geográficos exatos de cada uma das unidades agropecuárias.

Realizámos ainda outra análise com variáveis climáticas, baseada numa fonte distinta. Uma vez que ao longo das últimas décadas tem ocorrido um fenómeno de aquecimento global que tem originado alterações climáticas significativas um pouco por todo o globo, e também no caso específico da Península Ibérica (Ribeiro *et al.*, 2020), optámos por utilizar dados climáticos que refletissem a situação climática atual. Por este motivo,

usámos também dados providos pela plataforma *E-Obs gridded dataset (21.0)*, disponibilizada pela *European Climate Assessment & Dataset*<sup>14</sup>. Esta base de dados contém todos os registos diários de temperatura, precipitação e pressão atmosférica desde 1950 até 2019 e dispõe de uma resolução espacial idêntica à da *WorldClim*. Extraímos dados sobre as seguintes variáveis: precipitação acumulada e temperaturas média, mínima e máxima diárias. Os dados recolhidos cobriram um período de cinco anos consecutivos, iniciando-se em 1 de janeiro de 2012 e terminando a 31 de dezembro de 2016. O cálculo do valor de cada variável num ponto específico resultou do valor médio registado ao longo de todos os dias no período de estudo definido.

Focando agora a análise nos dados do tipo de solo, os registos considerados foram recolhidos a partir da base de dados disponibilizada pela plataforma *SoilGrids*, que é um sistema de mapeamento digital baseado numa compilação global de dados de perfis de solo, associados a uma alta resolução espacial – 1 km x 250 m – (Hengl *et al.*, 2017). Os dados permitiram analisar a distribuição percentual do tamanho das partículas, à superfície (0 cm de profundidade) em cada localização. As três classificações (variáveis) consideradas nesta análise foram as percentagens de: argila (fragmentos com dimensão < 2 µm); siltito (2–50 µm); areia (> 50 µm). O processo de extração dos dados relativos ao tipo de solo foi idêntico ao que havia sido explicado para as variáveis climáticas.

#### **4.2.3 – Análise univariada entre as biovariáveis e a presença de peeira**

Inicialmente indagámos sobre a eventual existência de correlações estatisticamente significativas entre a variável dependente (presença ou ausência de peeira) e as variáveis independentes (21 biovariáveis) através de uma análise univariada, segundo um modelo de regressão logística, o qual utiliza o método da máxima verosimilhança. Nesta avaliação, em que se estima o efeito de cada variável isoladamente, foram considerados três níveis de significância de 95, 99 e 99,9%.

#### **4.2.4 – Desenvolvimento e validação de modelos multifatoriais**

Após aplicada a análise univariada, avaliaram-se simultaneamente múltiplas variáveis independentes, determinando quais os efeitos produzidos na variável dependente. Assim, o objetivo desta etapa foi estudar a associação entre a presença/ausência de peeira nas explorações e o efeito simultâneo de vários parâmetros das variáveis ambientais registados nessa localização. Recorremos a um modelo de regressão logística, tendo sido consideradas apenas as variáveis obtidas a partir das bases de dados *WorldClim* e *SoilGrids*. Neste processo, os dados referentes ao *dataset E-Obs* foram preteridos em detrimento dos da *WorldClim*, dado que, não obstante ambos analisarem

---

<sup>14</sup> <https://www.ecad.eu/>

o mesmo tipo de parâmetros, esta base inclui mais variáveis e, logo, permite efetuar um maior número de interações para obter um modelo estatístico mais ajustado à variável de resposta.

Para a análise multifatorial construímos três modelos seguindo metodologias diferentes, os quais foram depois comparados através do cálculo dos parâmetros precisão, sensibilidade, especificidade, VPP e VPN. Estes índices permitiram-nos determinar sobre qual o modelo mais ajustado para explicar a presença ou ausência de peira nas explorações.

O primeiro modelo foi definido de uma maneira simples, tendo sido incluídas todas as variáveis que revelaram significância estatística na análise univariada. No segundo modelo inserimos inicialmente a totalidade das variáveis com significância estatística na análise univariada, tendo sido tidas em conta eventuais relações de multicolinearidade entre as variáveis. De acordo com O'Hagan & McCabe (1975), a multicolinearidade corresponde a uma situação em que as variáveis preditivas se encontram altamente correlacionadas, o que se traduz na inclusão de informação redundante no modelo estatístico. Assim, as variáveis que apresentaram um fator de inflação da variância (VIF) superior a 10 foram sendo sucessivamente excluídas, até que restaram apenas variáveis com VIF mais baixo do que o limiar definido, tal como descrito por Echeverria *et al.* (2017). Alternativamente, a linearidade entre cada par de variáveis foi avaliada por via do coeficiente de correlação de *Pearson*, tendo-se eliminado determinada variável quando  $|r|$  fosse maior do que 0,7, tal como sugerido por Ramilo *et al.* (2017). Posteriormente, as variáveis remanescentes foram sendo retiradas segundo uma estratégia de eliminação regressiva. O critério determinava que as primeiras a descartar fossem as que apresentassem o valor p mais elevado, permanecendo aquelas que tiveram um valor p inferior a 0,2. A referida estratégia vem referida em Dohoo *et al.* (2010). Por último, o terceiro modelo correspondeu a uma versão intermédia entre as duas versões anteriores no que respeita ao número de variáveis incluídas. Este modelo privilegiou a maior taxa de acerto possível entre as suas previsões e as respostas obtidas nos inquéritos, de acordo com o número de observações corretamente preditas. A decisão de exclusão de cada variável baseou-se, simultaneamente, nos valores p obtidos e na diminuição dos critérios de *Akaike* e de *Schwarz*.

#### 4.2.5 – Construção de mapas de probabilidades

Foram construídos mapas de probabilidades relativos à presença ou ausência de peira nas explorações, após a validação dos modelos formulados. A expressão matemática que serviu de base para a elaboração desses mapas foi a seguinte:

$$Y = \log\left(\frac{P}{A}\right) = \alpha_i X_i + \beta$$

Na fórmula,  $Y$  representa a variável de resposta, ou seja, a probabilidade de existirem casos de peeira numa exploração localizada em determinada área,  $P$  é a presença de peeira,  $A$  corresponde à ausência da doença,  $X_i$  é o valor da biovariável em cada ponto específico,  $\alpha_i$  é o coeficiente dessa mesma variável e  $\beta$  representa o valor de interseção com o eixo das ordenadas quando  $X$  assume o valor zero. O *cut-off* definido para a decisão foi de 50%. A elaboração destes mapas de probabilidades de ocorrência de peeira no Alentejo foi executada com recurso ao software *Q-Gis (version 3.8.3)*.

#### 4.2.6 – Análise de agregados espaciais

A determinação de *clusters* espaciais de casos de peeira, tendo por base a localização das explorações, foi desenvolvida com recurso a métodos de estatística espacial (Kulldorff, 2001), tendo sido utilizado o *software* SaTScan™ (*version 9.6*). A análise meramente espacial foi implementada com recurso ao modelo de *Bernoulli*, ajustado para situações em que há apenas dois cenários, ou a exploração tem a doença ( $Y=1$ ) ou não ( $Y=0$ ). Foram então consideradas as coordenadas geográficas (latitude e longitude) dos centroides das 645 explorações, tendo sido divididas em dois subgrupos. Um incluiu explorações que registaram casos de peeira em 2016 ( $n=225$ ), enquanto o outro englobou as explorações que não registaram qualquer caso ( $n=420$ ). O modelo foi aplicado para a dimensão máxima do *cluster* definido em 50% do total da população em estudo, tal como descrito por Seixas *et al.* (2017). Esta é a abordagem que garante uma maior significância estatística. O formato circular foi usado para suportar a análise. O número de simulações do modelo de *Monte Carlo* definido para avaliar a significância estatística de cada *cluster* foi de 999, com um valor  $p$  mínimo de 0,05 para que fosse considerado um *hotspot* significativo para a peeira.

### 4.3 – Resultados

#### 4.3.1 – Caracterização da amostra

Na amostra que corresponde a esta parte do estudo foram usados 93,6% dos 689 inquéritos analisados no Capítulo 3 deste trabalho. A percentagem das explorações em que foi referido terem sido observados casos de peeira no ano de 2016 foi de 34,9%, estando este valor bastante próximo do registo médio que havia sido obtido aquando do cálculo da prevalência estimada para a peeira no Alentejo (34,5% com IC 95% [30,54; 38,54]).

Para um melhor entendimento sobre a localização geográfica das explorações pecuárias consideradas na análise podemos visualizar a Figura 4.1, a qual regista a posição geográfica das 645 unidades contempladas na análise. Aí, é possível diferenciar aquelas

em que foram observados animais com peeira durante o ano 2016, das outras em que não foram reportados quaisquer casos da afeção analisada. Pode-se constatar que os inquéritos recolhidos, devidamente validados com a obtenção das respetivas coordenadas geográficas, encontram-se dispersos um pouco por todas as sub-regiões do Alentejo.

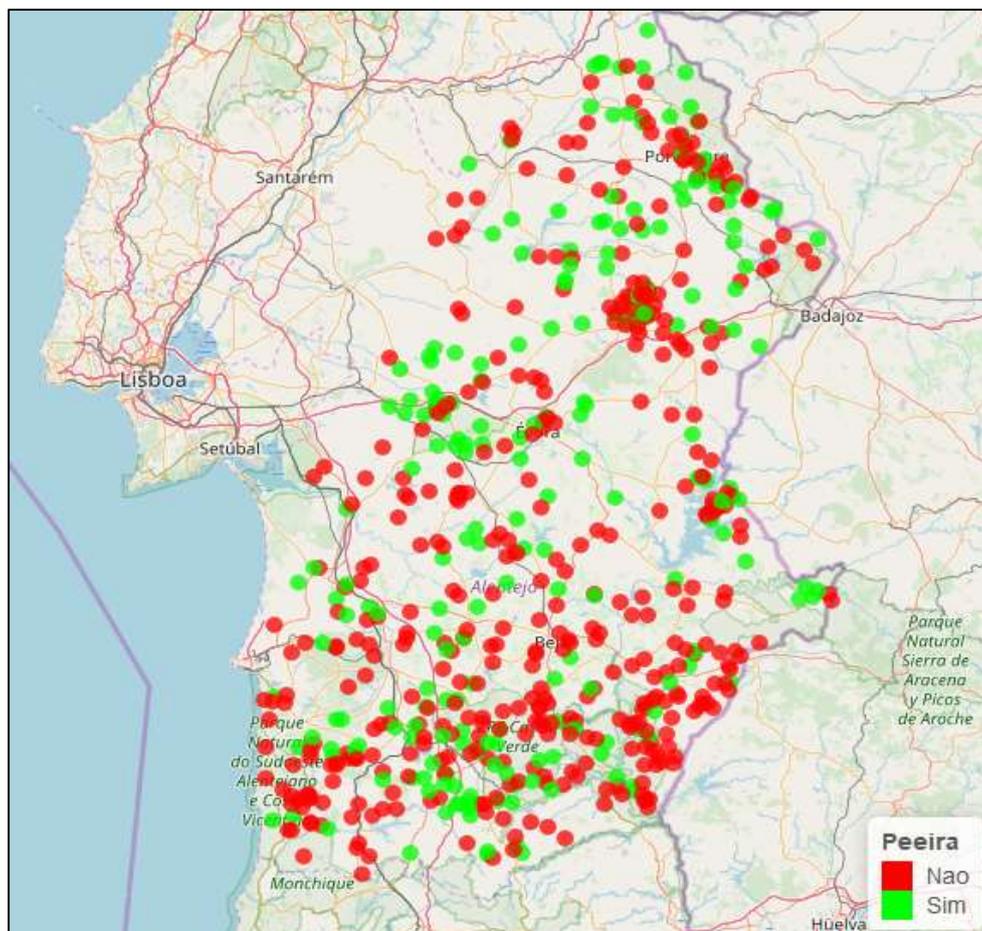


Figura 4.1 – Localização geográfica das explorações que em 2016 registaram (verde) ou não (vermelho) casos de peeira

Na Figura 4.2 é possível observar a distribuição geográfica das 225 explorações em que foram observados animais com peeira, distinguindo-se os três graus de severidade que foram definidos: residual (menos de 10% dos ovinos afetados), moderada (entre 10 e 30%) e severa (superior a 30%).

A Tabela 4.2 apresenta as estatísticas descritivas (média, quartis, extremos e desvio padrão) calculadas para as 21 variáveis climáticas e ambientais que foram analisadas.

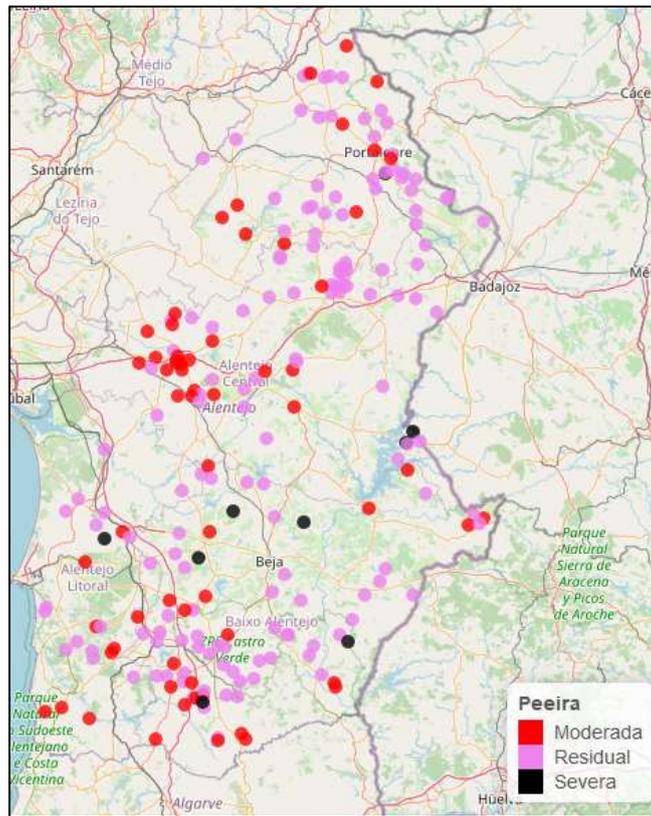


Figura 4.2 – Localização geográfica das explorações com casos de peeira, segundo o grau de severidade

Tabela 4.2 – Estatísticas descritivas referentes às 21 biovariáveis

Biovariáveis	Fonte	Unidade	Média	Mediana	Q1 – Q3	Mín – Máx	$\sigma$
B01	WC	°C	16,29	16,35	16,01 – 16,61	14,42 – 17,53	0,44
B05	WC	°C	28,16	28,2	27,7 – 28,68	24,75 – 30,44	0,85
B06	WC	°C	3,1	3,05	2,36 – 3,5	1,28 – 6,87	0,98
B08	WC	°C	11,26	11,37	10,81 – 11,72	8,97 – 12,78	0,68
B09	WC	°C	22,76	22,8	22,47 – 23,05	20,26 – 24,32	0,56
B10	WC	°C	23,03	23,02	22,75 – 23,37	20,44 – 24,36	0,55
B11	WC	°C	10,38	10,47	9,97 – 10,8	8,21 – 11,95	0,65
B12	WC	mm/m <sup>2</sup>	601,6	585,3	555,5 – 640,4	509,8 – 762,8	54,97
B13	WC	mm/m <sup>2</sup>	98,82	99	94,54 – 103,92	74,79 – 115,15	6,58
B14	WC	mm/m <sup>2</sup>	3,71	3	3 – 5	2 – 7,02	1,08
B16	WC	mm/m <sup>2</sup>	264,4	264	247,5 – 276,4	209,8 – 324,4	20,07
B17	WC	mm/m <sup>2</sup>	28,02	26	23 – 33	18,12 – 45,08	5,77
B18	WC	mm/m <sup>2</sup>	34,14	31,56	29 – 40,02	24,12 – 50,49	6,33
B19	WC	mm/m <sup>2</sup>	249	248,7	232,3 – 261,3	193,6 – 306,9	20,36
Prec	EO	mm/m <sup>2</sup>	536,73	536,36	508,64 – 557,81	448,34 – 655,3	40,17
Temp mín	EO	°C	11,15	11,14	10,54 – 11,69	8,91 – 13,18	0,85
Temp méd	EO	°C	16,78	16,89	16,47 – 17,17	14,65 – 17,73	0,51
Temp máx	EO	°C	23,33	23,29	22,94 – 23,81	20,96 – 24,58	0,62
Argila	SG	%	19,54	19,38	17,41 – 21,43	13,64 – 32,23	2,85
Siltito	SG	%	33,6	33,92	32,3 – 35,38	22,28 – 40,36	3,02
Areia	SG	%	47,26	46,36	44,29 – 49,5	33,67 – 64,02	4,61

Legenda: WC – WorldClim; EO – EObs; SG – SoilGrids; Prec – Precipitação; Temp – Temperatura; mín – mínima; méd – média; máx – máxima.

### 4.3.2 – Análise univariada

Para as análises elaboradas com base nos dados obtidos a partir da plataforma *WorldClim*, foi possível identificar a existência de correlação estatística com a ocorrência de peira em 11 variáveis. No caso das variáveis relacionadas com a temperatura, quatro delas (*B01*, *B06*, *B08* e *B11*) registaram diferenças estatisticamente significativas (Tabela 4.3), tendo todas elas apresentado coeficientes (valor  $\alpha$ ) com sinal negativo.

Tabela 4.3 – Variáveis relacionadas com a temperatura (*WorldClim*) que apresentam correlação estatística com a ocorrência de peira (valor  $p < 0,05$ )

Biovariáveis	Coefficiente	Constante	Valor p
B01 – Temperatura anual média	– 0,6191	9,4491	< 0,01
B06 – Temperatura mínima do mês mais frio	– 0,22027	0,04906	< 0,05
B08 – Temperatura média do trimestre mais húmido	– 0,3868	3,7177	< 0,01
B11 – Temperatura média do trimestre mais frio	– 0,3892	3,4057	< 0,01

No caso das variáveis relativas à precipitação, todas elas evidenciaram diferenças com significância relevantes (Tabela 4.4). A totalidade destas variáveis apresentou coeficientes com sinal positivo, estando assim diretamente relacionadas com a ocorrência de peira nas explorações.

Tabela 4.4 – Variáveis relacionadas com a precipitação (*WorldClim*) que apresentam correlação estatística com a ocorrência de peira (valor  $p < 0,05$ )

Biovariáveis	Coefficiente	Constante	Valor p
B12 – Precipitação anual	0,006561	– 4,590323	< 0,001
B13 – Precipitação no mês mais húmido	0,03144	– 3,74029	< 0,01
B14 – Precipitação no mês mais seco	0,32773	– 1,86078	< 0,001
B16 – Precipitação no trimestre mais húmido	0,015377	– 4,705233	< 0,001
B17 – Precipitação no trimestre mais seco	0,04863	– 2,00009	< 0,001
B18 – Precipitação no trimestre mais quente	0,04936	– 2,32525	< 0,001
B19 – Precipitação no trimestre mais frio	0,015694	– 4,548792	< 0,001

As comparações entre médias referentes aos dois grupos independentes (explorações com e sem peira) foram feitas com recurso ao teste *T de Student*, sendo que para as variáveis relacionadas com a temperatura, as variações percentuais ficaram enquadradas no intervalo [–6,4; –0,7]. No caso das sete variáveis pluviométricas o intervalo cifrou-se entre 1,3 e 10,6% (ver Tabela 4.5).

Tabela 4.5 – Diferença entre médias (presença/ausência de peeira) para as 11 variáveis significativas na análise univariada (WorldClim)

Biovariáveis	Peeira		Diferença		Valor <i>p</i>
	Não	Sim	IC 95%	Var. (%)	
B01	16,33	16,21	[-0,19; -0,05]	- 0,7	< 0,001
B06	3,17	2,97	[-0,36; -0,05]	- 6,4	< 0,05
B08	11,32	11,14	[-0,29; -0,07]	- 1,6	< 0,01
B11	10,44	10,28	[-0,27; -0,06]	- 1,5	< 0,01
B12	594,6	614,62	[11,2; 28,78]	+ 3,4	< 0,001
B13	98,35	99,68	[0,25; 2,38]	+ 1,3	< 0,01
B14	3,58	3,96	[0,21; 0,55]	+ 10,6	< 0,001
B16	262,22	268,35	[2,89; 9,34]	+ 2,3	< 0,001
B17	27,45	29,08	[0,71; 2,57]	+ 3,5	< 0,001
B18	33,44	35,44	[0,98; 3,01]	+ 6	< 0,001
B19	246,75	253,19	[3,15; 9,68]	+ 2,6	< 0,001

Legenda: Var. (%) – Variação percentual

Começamos a interpretação da análise feita sobre os dados recolhidos na plataforma *E-Obs* referindo que as quatro variáveis analisadas apresentaram diferenças estatisticamente significativas (Tabela 4.6). No caso da precipitação, nas explorações em que foi reportada a doença regista-se uma pluviosidade 2,1% superior à verificada naquelas que não reportaram casos de peeira. Na análise das três variáveis referentes à temperatura, as diferenças observadas foram bastante aproximadas, estando compreendidas entre -0,9 e -1,3% (Tabela 4.7).

Tabela 4.6 – Variáveis climáticas (*E-Obs*) que apresentam correlação estatística com a ocorrência de peeira nas explorações (valor *p* < 0,05)

Biovariáveis	Coeficiente	Constante	Valor <i>p</i>
Precipitação anual acumulada	0,007007	-4,39883	< 0,001
Média das temperaturas mínimas diárias	-0,212648	1,7642	< 0,05
Média das temperaturas médias diárias	-0,685527	10,8586	< 0,001
Média das temperaturas máximas diárias	-0,554623	12,2978	< 0,001

Tabela 4.7 – Diferença entre médias (presença/ausência de peeira) para as quatro variáveis climáticas (*E-Obs*)

Biovariáveis	Peeira		Diferença		Valor <i>p</i>
	Não	Sim	IC 95%	Var. (%)	
Precipitação	532,81	544,05	[4,73; 17,75]	+ 2,1	< 0,001
Temp mín	11,2	11,05	[-0,29; -0,01]	- 1,3	< 0,05
Temp méd	16,84	16,66	[-0,26; -0,09]	- 1,1	< 0,001
Temp máx	23,4	23,2	[-0,3; -0,1]	- 0,9	< 0,001

Legenda: Var. (%) – Variação percentual

Observando, por fim, as variáveis implicadas no tipo de solo (*SoilGrids*), registamos que apenas a variável *Argila* evidenciou significância estatística na regressão logística efetuada (Tabela 4.8). Neste caso, os dados obtidos indicam que o teor médio de argila no solo das explorações pecuárias em que a doença está ausente foi superior àquelas em que a peeira está presente (ver Tabela 4.9).

Tabela 4.8 – Variável relacionada com o tipo de solo que apresenta correlação estatística com a presença de peeira nas explorações (valor  $p < 0,05$ )

Biovariável	Coefficiente	Constante	Valor $p$
Argila	- 0,068583	0,7098	< 0,05

Tabela 4.9 – Diferença entre médias (presença/ausência de peeira) para o teor de argila

Biovariável	Peeira		Diferença		Valor $p$
	Não	Sim	IC 95%	Var. (%)	
Argila	19,73	19,18	[-1,01; -0,09]	- 2,8	< 0,05

Legenda: Var. (%) – Variação percentual

### 4.3.3 – Construção de modelos de regressão logística – análise multivariada

Para a construção dos modelos de regressão logística, considerámos as 17 variáveis facultadas pelas bases de dados *WorldClim* e *SoilGrids*. Este tipo de variáveis climáticas e ambientais costumam apresentar elevada correlação entre si (Chaiyos *et al.*, 2018), facto que poderá dificultar a correta interpretação dos coeficientes obtidos nos modelos multivariados, caso as questões de multicolinearidade e linearidade entre variáveis não sejam tidas em consideração. Neste caso concreto, testámos esta eventualidade e verificámos que um elevado número de variáveis climáticas apresentou significância estatística na análise univariada face à variável dependente. Este facto poderá ser explicado pela presença de elevadas correlações existentes entre algumas das variáveis, tanto no sentido positivo como negativo. Este facto pode ser observado de forma detalhada na matriz que agrega os resultados destes testes de correlação efetuados sobre as 17 variáveis consideradas (Gráfico 4.1). As circunferências de coloração azul mais escuro indicam uma correlação direta quase total, enquanto as de cor vermelho escuro indicam uma correlação inversa forte.

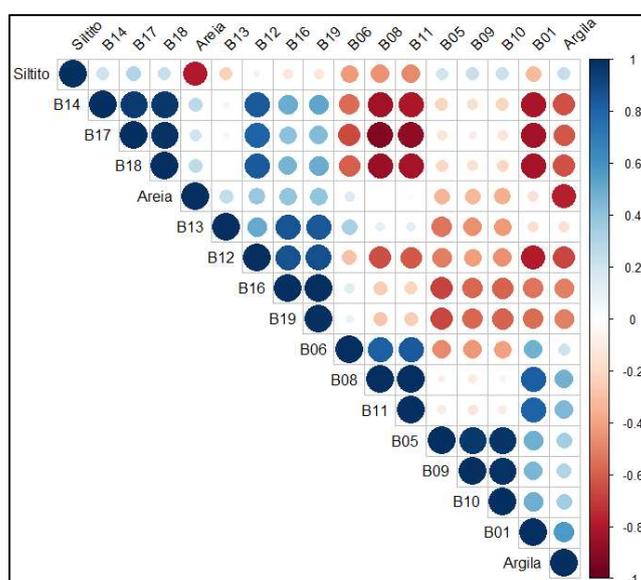


Gráfico 4.1 – Matriz de correlação para as 17 variáveis, baseado nos valores de  $|r|$

Tal como já previamente referido, construímos três modelos segundo diferentes metodologias:

- **Modelo nº 1**

O primeiro modelo serviu como base de comparação para os restantes, uma vez que não envolveu qualquer tipo de análise de decisão no que respeita à inclusão/exclusão de variáveis. Tal como podemos constatar através da observação da Tabela 4.10, que sintetiza os parâmetros do Modelo 1, a maioria das variáveis não apresenta significância estatística, devido aos problemas associados à multicolinearidade entre variáveis.

Tabela 4.10 – Modelo multifatorial nº 1 para a ocorrência de peeira (12 variáveis)

Var. dependente: Peeira (n=645)	Coefficiente	Erro padrão	Declive	Valor p
<b>B01</b>	- 0,3227	0,598579	- 0,0722010	0,59
<b>B06</b>	- 0,67022	0,294132	- 0,149954	< 0,05
<b>B08</b>	- 3,3658	3,49879	- 0,753062	0,34
<b>B11</b>	3,47717	3,63269	0,777979	0,34
<b>B12</b>	0,0204	0,0272389	0,0045633	0,45
<b>B13</b>	- 0,02404	0,109423	- 0,00537796	0,83
<b>B14</b>	1,1445	0,355411	0,25607	< 0,01
<b>B16</b>	0,06883	0,0744852	0,015401	0,36
<b>B17</b>	- 0,48349	0,156448	- 0,108176	< 0,01
<b>B18</b>	0,09933	0,0953254	0,0222249	0,3
<b>B19</b>	- 0,08123	0,104315	- 0,0181748	0,44
<b>Argila</b>	0,05565	0,0443746	0,0124516	0,21
Constante	5,40091	10,6081		0,61
R <sup>2</sup> McFaden = 0,051128		R <sup>2</sup> ajustado = 0,019963		
Critério Akaike = 817,6191		Critério Schwarz = 875,7194		

- **Modelo nº 2**

Para a construção do segundo modelo de regressão logística, calcularam-se os VIF para as 12 variáveis inicialmente incluídas. Tal como era expectável, vários dos valores VIF obtidos encontravam-se fora dos parâmetros definidos (VIF > 10). Deste modo, estamos então perante uma situação de multicolinearidade, o que comprova a elevada correlação existente entre algumas variáveis climáticas. Procedemos de seguida à remoção sequencial das variáveis que apresentavam os VIF mais elevados, restando no final cinco variáveis (Tabela 4.11).

Tabela 4.11 – VIF e valor de tolerância para as cinco variáveis que têm VIF < 10

Biovariável	Tolerância	VIF
B01	0,316	3,16
B06	0,53	1,89
B13	0,759	1,32
B14	0,255	3,93
Argila	0,556	1,8

Seguidamente, procedemos à remoção sucessiva das variáveis que apresentavam valores  $p$  mais elevados no modelo da máxima verosimilhança. No final do processo permaneceram três delas com valor  $p$  inferior a 0,2: *B06* (*Temperatura mínima no mês mais frio*), *B13* (*Precipitação no mês mais húmido*) e *B14* (*Precipitação no mês mais seco*) (Tabela 4.12). Tal como podemos constatar pela visualização da Tabela 4.13, nenhum dos pares de variáveis apresentou um valor de  $|r|$  superior a 0,7.

Tabela 4.12 – Modelo multifatorial nº 2 para a ocorrência de peeira (3 variáveis)

Var. dependente: Peeira (n=645)	Coeficiente	Erro padrão	Declive	Valor $p$
<b>B06</b>	- 0,168049	0,119769	- 0,0378904	0,16
<b>B13</b>	0,0364735	0,014449	0,00822378	< 0,05
<b>B14</b>	0,234774	0,0977949	0,0529351	< 0,05
Constante	- 4,60259	1,29471		< 0,001
R <sup>2</sup> McFaden = 0,029742		R <sup>2</sup> ajustado = 0,020153		
Critério de Akaike = 817,4608		Critério Schwarz = 835,3378		

Tabela 4.13 – Coeficiente de correlação de Pearson entre as variáveis do modelo nº 2

	<b>B06</b>	<b>B13</b>	<b>B14</b>
<b>B06</b>	1	0,327	-0,551
<b>B14</b>	0,327	1	0,13
<b>B17</b>	-0,551	0,13	1
Significância: valor $p < 0,001$			

- **Modelo nº 3**

Para construir este último modelo, tomámos de novo o lote de variáveis significativas na análise univariada, prosseguindo depois com a gradual eliminação de variáveis de modo a maximizar a percentagem de observações corretamente preditas pelo modelo. Logo, nem sempre o critério de exclusão foi o mesmo, mas as variáveis que apresentavam valores  $p$  superiores e que aumentavam o valor dos critérios de Akaike e de Schwarz foram as primeiras a ser excluídas. O momento a partir do qual a exclusão de qualquer variável passou a estar associado a uma redução da precisão do modelo consumou a definição do conjunto final de variáveis a incluir neste modelo. Os parâmetros deste modelo composto por seis variáveis (*B06*, *B08*, *B11*, *B12*, *B14* e *B17*) estão apresentados na Tabela 4.14.

Tabela 4.14 – Modelo multifatorial nº 3 para a ocorrência de peeira (6 variáveis)

Var. dependente: Peeira (n=645)	Coefficiente	Erro padrão	Declive	Valor p
<b>B06</b>	-0,492295	0,194082	-0,110321	< 0,05
<b>B08</b>	-3,9478	2,7641	-0,884681	0,15
<b>B11</b>	3,79892	2,65734	0,851318	0,15
<b>B12</b>	0,008095	0,00336942	0,00181397	< 0,05
<b>B14</b>	1,16251	0,334326	0,260512	< 0,001
<b>B17</b>	-0,319998	0,0863503	-0,0717099	< 0,001
Constante	5,63281	7,14988		< 0,001
R <sup>2</sup> McFaden = 0,046439		R <sup>2</sup> ajustado = 0,029658		
Critério de Akaike = 809,5305		Critério Schwarz = 840,8153		

#### 4.3.4 – Validação dos modelos

Após a definição das variáveis a incluir nos três modelos, procedemos ao cálculo dos parâmetros epidemiológicos associados a cada um deles (Tabela 4.15). De uma forma geral, não foram observáveis diferenças muito significativas no que respeita ao grau de precisão dos modelos (variação entre 65,4 e 67%), sendo que todos possuem reduzidos valores de sensibilidade e índices de especificidade elevados. As Tabelas 4.16, 4.17 e 4.18 apresentam o confronto entre as situações previstas e as reais, para os três modelos estudados respetivamente.

Tabela 4.15 – Comparação entre os parâmetros epidemiológicos dos três modelos

Modelo	Nº 1	Nº 2	Nº 3
<b>Nº Variáveis</b>	12	3	6
<b>Precisão (%)</b>	66,2	65,4	67
<b>IC95% Precisão</b>	[0,624; 0,699]	[0,616; 0,691]	[0,632; 0,706]
<b>Sensibilidade (%)</b>	14,2	10,2	16,4
<b>Especificidade (%)</b>	94,1	95	94,1
<b>VPP (%)</b>	56,1	52,3	59,7
<b>VPN (%)</b>	67,2	66,4	67,8

Tabela 4.16 – Matriz de frequências cruzadas (Modelo nº1)

		Predito	
		Não	Sim
Real	Não	395	25
	Sim	193	32

Tabela 4.17 – Matriz de frequências cruzadas (Modelo nº2)

		Predito	
		Não	Sim
Real	Não	399	21
	Sim	202	23

Tabela 4.18 – Matriz de frequências cruzadas (Modelo nº3)

		Predito	
		Não	Sim
Real	Não	395	25
	Sim	188	37

#### 4.3.5 – Construção de mapas de probabilidade

No processo seguinte, procedemos à formulação de mapas de previsão de probabilidade sobre a presença/ausência de doença. Nesta etapa utilizámos exclusivamente os modelos estatísticos 2 e 3. Na realidade, decidimos excluir desta fase o Modelo nº 1, uma vez que este apresenta inúmeras variáveis com valores de p que não foram considerados significativos, em virtude da existência das situações de colinearidade.

Realizámos então a extração dos dados referentes às probabilidades segundo os dois modelos definidos, os quais estão expressos na Figura 4.3. Não obstante estes mapas abrangerem a Península Ibérica no seu todo, bem como a área sudoeste de França e parte do território noroeste do continente africano, os valores probabilísticos só devem ser considerados válidos para o Alentejo, uma vez que os modelos não foram testados fora dessa região.

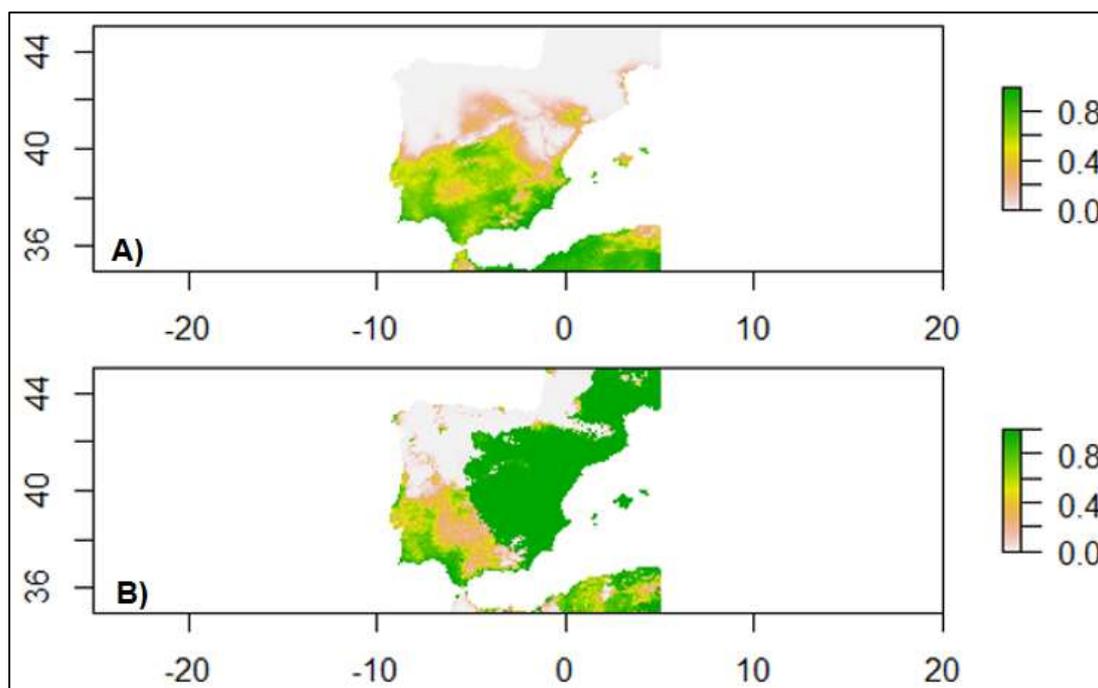


Figura 4.3 – Mapa de probabilidade de ocorrência de peira segundo os modelos 2 (A) e 3 (B)

Pela observação da Figura 4.4 visualizamos a localização bidimensional das explorações consideradas neste estudo. As cores utilizadas para localizar as explorações servem para distinguir as diferentes combinações entre a presença/ausência de peira e atribuição de um diagnóstico correto/incorrecto por parte de cada modelo. As quatro classificações possíveis foram as seguintes:

- **verdadeiros positivos (VP)** – explorações com presença de doença em que o diagnóstico foi correto (azul);
- **verdadeiros negativos (VN)** – explorações sem presença de doença em que o diagnóstico foi correto (verde);
- **falsos positivos (FP)** – explorações sem presença de doença em que o diagnóstico foi incorreto (laranja);

- **falsos negativos (FN)** – explorações com presença de doença em que o diagnóstico foi incorreto (vermelha);

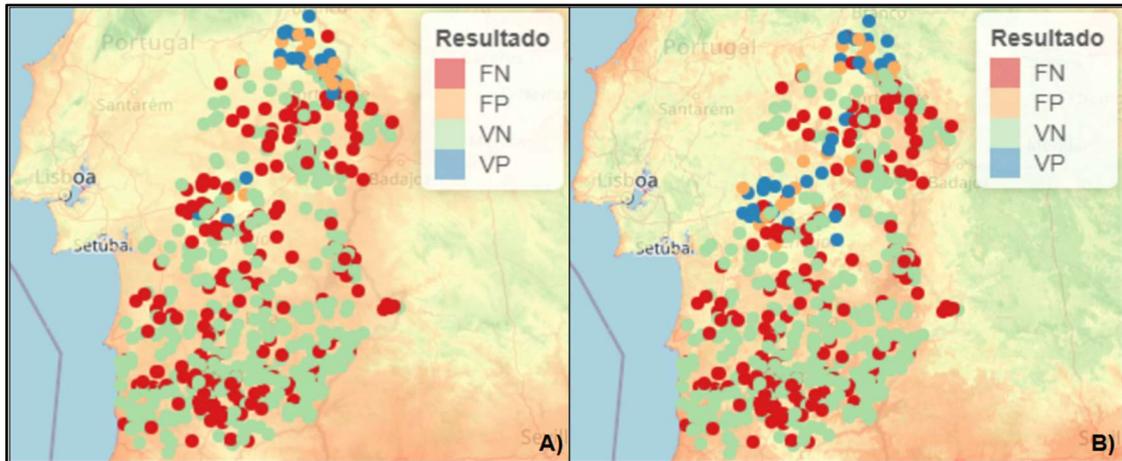


Figura 4.4 – Localização das explorações classificadas com VP, VN, FP e FN segundo os modelos 2 (A) e 3 (B)

As Figuras 4.5 e 4.6 representam os mapas de probabilidade após extração focalizada especificamente para as sub-regiões do Alentejo, segundo os modelos 2 e 3 respetivamente. Para interpretação das imagens, as áreas mais escuras são aquelas em que, segundo cada modelo, existe uma maior probabilidade de ocorrência de doença, enquanto as áreas mais claras são as que apresentam uma menor possibilidade de ocorrência de casos de peeira nas explorações.

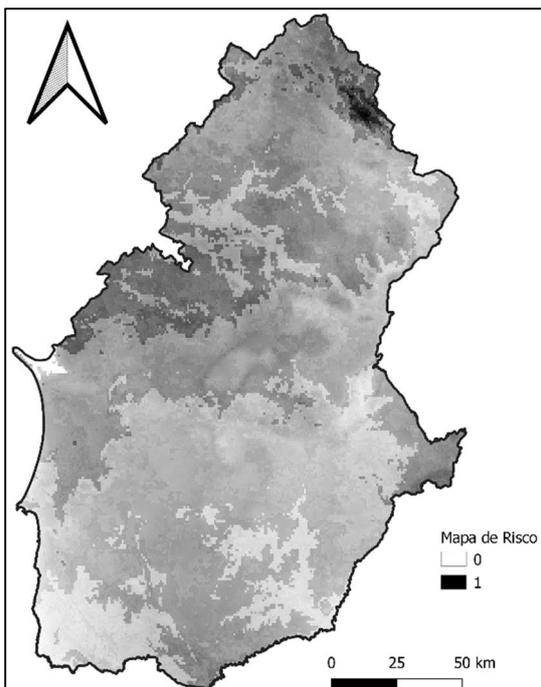


Figura 4.5 – Mapa de probabilidade de ocorrência de peeira no Alentejo, segundo o modelo 2

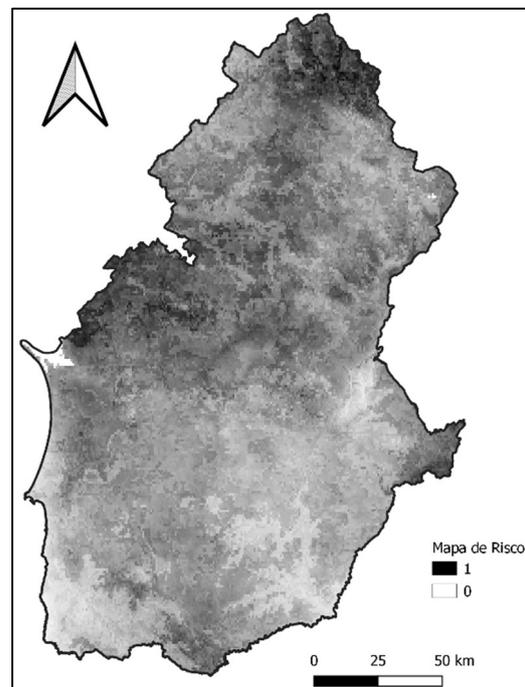


Figura 4.6 – Mapa de probabilidade de ocorrência de peeira no Alentejo, segundo o modelo 3

#### 4.3.6 – Análise de agregados espaciais

Para proceder à análise de agregados espaciais utilizámos o modelo espacial de *Bernoulli*, cuja aplicação permitiu identificar a existência de sete potenciais *clusters* territoriais na região estudada (Figura 4.7). Será de realçar que nestes locais, a prevalência estimada de peira registou valores consideravelmente superiores à média observada para a região Alentejo. Os sete concelhos abrangidos por estes possíveis *hotspots* são Almodôvar, Avis, Barrancos, Montemor-o-Novo, Nisa, Odemira e Portalegre.

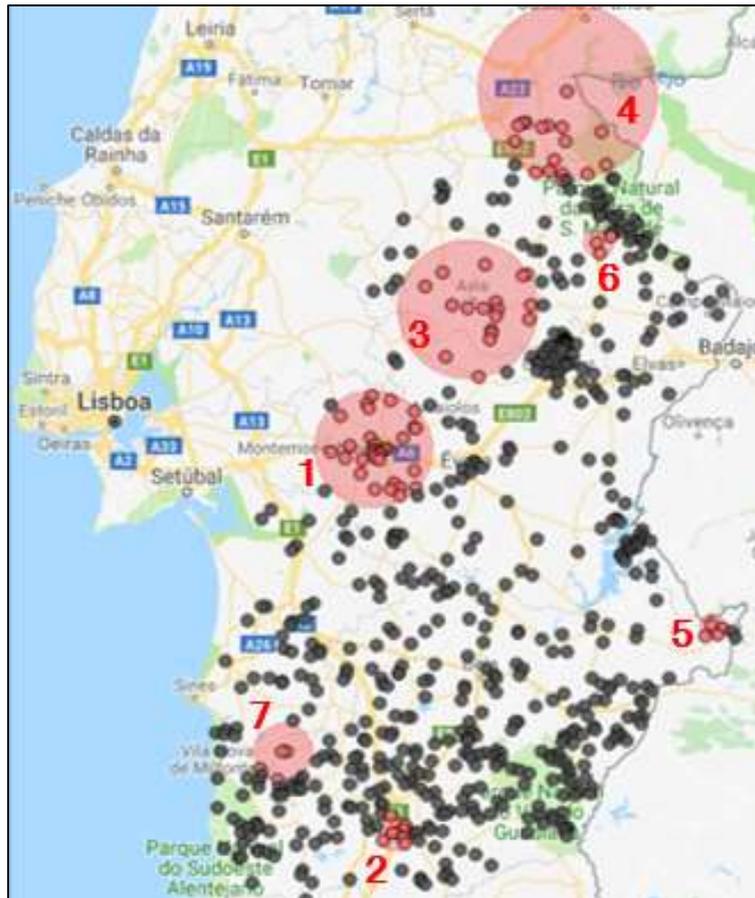


Figura 4.7 – Identificação de potenciais hotspots para a peira na análise territorial

A observação dos parâmetros desta análise revelou que entre os sete *clusters* apresentados, apenas o foco localizado no concelho de Montemor-o-Novo evidenciou significância estatística (valor  $p < 0,01$ ) (Tabela 4.19). Este *hotspot* para a doença foi evidenciado pelos inquéritos recolhidos em 33 explorações pecuárias, abrangendo uma superfície circular com raio de 17,9 Km. A proporção dos respetivos efetivos que evidenciou casos de peira ascendeu a 75,8%, sendo este valor superior ao dobro da taxa de prevalência global registada para a região Alentejo. Nos restantes seis polos referidos, a prevalência registada também foi muito superior à verificada no conjunto da região, mas devido à reduzida amostragem os resultados não puderam ser considerados estatisticamente significativos.

Tabela 4.19 – Análise de agregados espaciais de peira em explorações do Alentejo

<b>Cluster</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>
<b>Localização</b>	<b>Montemor</b>	<b>Almodôvar</b>	<b>Avis</b>	<b>Nisa</b>	<b>Barrancos</b>	<b>Portalegre</b>	<b>Odemira</b>
<b>Raio (km)</b>	17,93	5,68	21,04	26,75	4,38	3,83	8,92
<b>População</b>	33	8	18	17	4	4	4
<b>Casos Observados</b>	25	8	13	12	4	4	4
<b>Casos Esperados</b>	11,49	2,79	6,27	5,92	1,39	1,39	1,39
<b>Rácio Obs/Esp</b>	2,18	2,88	2,07	2,03	2,88	2,88	2,88
<b>% casos</b>	75,8	100	72,2	70,6	100	100	100
<b>OR</b>	12,2	8,5	5,4	4,6	4,2	4,2	4,2
<b>Valor p</b>	< 0,01	0,124	0,754	0,972	0,999	0,999	0,999

Legenda: Obs – casos observados; Esp – casos esperados

#### 4.4 – Discussão

Quando realizámos a análise univariada sobre a existência de peira nas explorações pecuárias, considerando o universo de 14 variáveis climáticas da base *WorldClim*, foi possível identificar diferenças estatisticamente significativas em 11 delas. No que respeita às sete variáveis relacionadas com a temperatura, em quatro destas foi observada uma diferença estatística significativa (*Temperatura anual média*, *Temperatura mínima no mês mais frio*, *Temperatura média no trimestre mais frio* e *Temperatura média no trimestre mais húmido*). O padrão da diferença verificado nestas biovariáveis foi sempre o mesmo, uma vez que as temperaturas médias registadas na localização das explorações com casos da doença foram sempre inferiores às observadas nas coordenadas geográficas das herdades que não apresentaram casos de doença no ano 2016. Neste conjunto de variáveis, a maior diferença ocorreu para a *Temperatura mínima no mês mais frio*, tendo nesse período as explorações com casos de peira uma temperatura mínima média 6,4% inferior à das explorações sem registos da doença.

Nas observações relacionadas com a pluviosidade, a diferença entre os dois grupos (presença/ausência de casos de peira em 2016) foi ainda mais expressiva, dado que todas as variáveis exibiram diferenças significativas. Também para estas variáveis a tendência foi uniforme, já que a pluviosidade média registada nos locais correspondentes às coordenadas geográficas das explorações com peira superou sempre a verificada nas localizações sem doença. Entre estas variáveis, a *Precipitação no mês mais seco* foi aquela que registou diferenças mais expressivas, tendo as explorações que afirmaram ter a doença registado uma precipitação 10,6% superior à verificada nas outras.

Em suma, para locais expostos a temperaturas inferiores, as explorações exibiram uma maior probabilidade de reportar casos de peeira. Se analisarmos esta indicação de forma isolada, poderemos ficar surpreendidos se tivermos em conta que usualmente os resultados científicos, adiante referidos, apontam em sentido contrário, ou seja as temperaturas mais elevadas favorecem a disseminação da doença. Todavia, tais estudos provêm sistematicamente de trabalhos experimentais efetuados no Reino Unido, onde o contexto climático é claramente distinto do verificado no Alentejo.

De acordo com a bibliografia empírica, o valor de temperatura acima do qual a bactéria *D. nodosus* tem condições ideais para a sua expressão é 10°C (Graham & Egerton, 1968; Abbott & Lewis, 2005). Ainda assim, Muzafar *et al.* (2016) referem mesmo que com temperaturas de 5°C é ainda possível ocorrer a disseminação do agente etiológico entre animais. Segundo os dados da *WorldClim* recolhidos nas 645 explorações da nossa amostra, a *Temperatura média no trimestre mais frio (B11)* foi de 10,4 °C, o que significa que na maioria das explorações e durante a maior parte do ano a temperatura média supera o valor citado como sendo o mais propício para a expressão da doença. Assim, cremos que o facto de no Alentejo se ter registado uma maior possibilidade de ocorrência da doença nas explorações sujeitas a temperaturas mais reduzidas é uma consequência de, neste contexto epidemiológico, os meses mais frios coincidirem com aqueles que têm uma precipitação acumulada superior (Fraga *et al.*, 2020).

Deste modo, a evidência que verificámos permite-nos concluir que o fator crítico para o aparecimento de sinais clínicos da doença no Alentejo deverá ser o nível da pluviosidade, já que a temperatura ambiente média na região se encontra, quase sempre, dentro dos parâmetros que maximizam a expressão da doença. Esta tendência verifica-se não só para os dados na nossa amostra, mas foi também reconhecida no recente trabalho de Fraga *et al.* (2020), tendo os autores analisado a região Alentejo no seu todo.

Esta é uma situação absolutamente diferente da ocorrida no Reino Unido, onde os períodos de chuva ocorrem com alguma uniformidade ao longo de todo o ano, não sendo associado a um determinado padrão de pluviosidade (Wreford & Topp, 2020), o que justifica que a transmissão da doença possa ocorrer em qualquer mês (Hosie, 2004). Nesse cenário, o fator limitante será a temperatura, já que frequentemente a temperatura ambiente é inferior a 10°C. A realidade alentejana acaba por ter neste parâmetro maior similaridade com o padrão que ocorre na Austrália, onde existe um período do ano com uma maior concentração de pluviosidade, correspondendo à época em que há maior aglomeração de casos clínicos da doença (Graham & Egerton, 1968).

No que respeita à pluviosidade, a tendência registada foi assim inversa à observada para a temperatura, dado que as unidades localizadas em áreas mais expostas à precipitação apresentaram maior probabilidade de reportar casos de peeira. Esta última indicação está em conformidade com o padrão descrito há várias décadas por Graham & Egerton

(1968), que referiam explicitamente que a abundância de chuva constituía um fator de risco para a propagação da peeira na espécie ovina. Estudos mais recentes confirmam esta tendência (Ghimire & Egerton, 1996; Wassink *et al.*, 2003; Green & George, 2008; Kaler & Green, 2009), pelo que os resultados no nosso estudo não são de todo surpreendentes. Ainda assim, enfatizamos a robustez desta investigação, uma vez que a tendência identificada foi similar para todas as variáveis tratadas. A interpretação torna-se ainda mais notável se tivermos em consideração que estamos a suprimir desta análise todas as características relacionadas com a própria exploração, em especial o tipo de manejo e as opções terapêuticas, fatores esses que podem desempenhar papel dominante na expressão da doença ao nível de cada unidade pecuária, tal como foi reconhecido na análise descrita no Capítulo 3.

Tendo em conta a análise elaborada com recurso aos dados recolhidos na plataforma *E-Obs*, verificamos que as quatro variáveis examinadas revelaram diferenças estatisticamente significativas, sendo que a pluviosidade acumulada foi superior nas explorações que afirmam ter peeira, enquanto os valores médios da temperatura mínima, máxima e média diárias foram superiores nas explorações em que a doença não foi reportada. Assim, verificamos que as conclusões obtidas seguem exatamente a mesma linha de tendência verificada na análise com os valores facultados pela base *WorldClim*. Recordemos que na análise efetuada com as informações recolhidas *E-Obs gridded dataset* considerámos o período temporal 2012-2016, enquanto na outra base utilizámos os dados referentes a um período mais longo e menos atual, em concreto 1970-2000. O facto de termos registado conclusões convergentes nestes períodos com um lapso temporal tão assinalável permite-nos indiciar que as diferentes condições climáticas registadas entre explorações em que a peeira está presente/ausente têm-se mantido estáveis ao longo das últimas décadas. Desta forma, podemos assumir que nem mesmo a reconhecida tendência de aquecimento global, que tem assolado o nosso planeta (Soutter & Möttus, 2020) e também no caso do Alentejo (Carvalho *et al.*, 2020), parece ter alterado significativamente esta relação.

Tendo agora em consideração os aspetos relativos ao tipo de solo, foram avaliadas três variáveis (*SoilGrids*) mas só numa delas (*teor em argila*) foi possível identificar correlação estatística significativa com a ocorrência de peeira. Os nossos dados indiciam então que na localização das explorações pecuárias com peeira, o valor médio da proporção de argila no solo é mais reduzido, comparativamente com os locais das unidades que não reportaram a doença (19,18 vs 19,73%). Apesar de a diferença não ser muito expressiva (-2,8%), esta ocorre no sentido oposto ao que seria expectável, uma vez que, segundo os trabalhos de Muzafar *et al.* (2016), a sobrevivência da *D. nodosus* será maior em solos do tipo argiloso. Porém, os autores referem que este tipo de solos tem um teor de argila superior a 44%. Ora, valores dessa magnitude não foram registados no Alentejo, pois entre os 645 registos obtidos o teor máximo foi de 32,2%. Deste modo, não cremos ser possível confrontar de forma linear estas duas conclusões, já que pelo critério definido

por Muzafar *et al.* (2016) nenhum dos registos da nossa amostra seria classificado como solo do *tipo argiloso*.

Podemos então conjecturar sobre três potenciais justificações para a não identificação da mesma tendência referida por Muzafar *et al.* (2016). A primeira hipótese baseia-se na definição utilizada para a categoria *argila*, a qual corresponde a fragmentos de solo com dimensão inferior a 2µm, mas nada diz do ponto de vista químico e bioquímico. Assim, desconhecemos se a argila considerada pelos autores Muzafar *et al.* (2016) pode ser diretamente comparável com aquela que está presente nos solos do Alentejo, já que a taxa de sobrevivência do agente etiológico da peeira poderá ser bastante diferente. Os estudos de Moynihan *et al.* (2015) indicam mesmo que a sobrevivência de agentes patogénicos no solo depende não só de fatores físico-químicos, tais como humidade, temperatura, textura ou pH, mas também das suas condicionantes biológicas.

A segunda hipótese está relacionada com o método de recolha dos dados referentes à constituição dos solos que foi utilizado no nosso estudo. Uma vez que apenas dispúnhamos das coordenadas geográficas do centroide de cada exploração, ao extrair os dados definimos a área alvo como um círculo com o mesmo raio em todos os pontos geográficos. Sabíamos à partida que tal procedimento poderia enviesar ligeiramente a localização exata da exploração, mas como não tínhamos informação relativa aos limites geográficos de cada unidade, não tínhamos alternativa viável a este procedimento. Se no caso das variáveis climáticas é expectável que não existam grandes variações dentro da área de cada exploração, o mesmo pode não ocorrer relativamente ao tipo de solo, uma vez que são unidades de grande dimensão e podem apresentar significativa heterogeneidade do solo no seio de cada herdade, tal como já referimos no Capítulo 3. Assim, esta justificação prende-se com a falta de precisão do método de recolha da informação sobre a localização das unidades pecuárias.

O último cenário proposto leva-nos a suspeitar que, no contexto epidemiológico do Alentejo, o tipo de solo não evidenciará tanta relevância na patogénese da doença como aquela já descrita por outros autores em regiões diversas. Assim, cremos ter deixado bem patente a necessidade de aprofundar a investigação neste domínio, mormente através da avaliação da relação entre o teor de argila no solo e a capacidade de sobrevivência e transmissão da bactéria *D. nodosus*, perante condições ideais de temperatura e humidade. De facto, a eventual influência do tipo de solos na propagação da peeira não terá ficado cabalmente esclarecida, sendo, por isso, uma das vias promissoras a explorar em pesquisas vindouras, nomeadamente através da realização de ensaios sobre a viabilidade da bactéria *D. nodosus* em diferentes tipos de solo.

Da análise dos modelos multifatoriais desenvolvidos para determinar a probabilidade de ocorrência de doença nas explorações, registamos que os respetivos valores de especificidade são bastante elevados. A razão para tal, pode estar centrada na reduzida sensibilidade dos modelos, o que em termos práticos se traduz na projeção de uma

elevada quantidade de casos falsos negativos. Ainda assim, temos de ter em consideração que estes modelos realizam previsões baseando-se exclusivamente em fatores climáticos, o que limita o seu alcance. Deste modo, estes modelos não têm em conta, por exemplo, outros aspetos como sejam as especificidades do maneio usadas em cada exploração que, tal como observado no Capítulo 3, também desempenham um papel importante na probabilidade de ocorrência da doença na exploração. Recordemos que várias dessas particularidades foram mesmo classificadas como fatores de risco para a doença.

Pela comparação dos resultados dos três modelos, constatamos que aquele que apresenta parâmetros analíticos mais favoráveis é o modelo nº 3, em virtude de registar o critério de *Akaike* mais reduzido, bem como valores superiores relativamente à percentagem de previsões corretas, à sensibilidade e aos VPP e VPN. Ainda assim, poderá não ser óbvio encontrar uma interpretação lógica para o resultado exibido pela variável *B17* (*Precipitação no trimestre mais seco*). De facto, esta apresenta significância estatística e exibe um valor  $\alpha$  (coeficiente) oposto, em termos de sentido do sinal, ao obtido na análise univariada. Contudo, relembramos que este mesmo modelo também incorpora a variável *B14* (*Precipitação no mês mais seco*). Ora, no caso concreto do Alentejo, tanto o mês como o trimestre mais secos ocorrem invariavelmente durante o Verão, sendo esta estação do ano correspondente ao período em que a precipitação é praticamente inexistente na região (Surová & Pinto-Correia, 2016). Assim, será expectável que as variáveis *B14* e *B17* se anulem quando analisadas num modelo multivariado, já que este analisa o efeito de cada variável quando as restantes se mantêm constantes (Chamberlain, 1982). Deste modo, caso ocorra um ligeiro acréscimo na precipitação no mês mais seco, e assumindo que este se inclui no trimestre mais seco, a tendência nos outros dois meses terá sido inversa, daí resultando dois sinais opostos em duas variáveis que estão interligadas num contexto climático específico como o do Alentejo. Recordemos que apesar de estarmos a referir-nos a uma variável que apresentou significância estatística na análise univariada (*B14*), os valores médios registados nas explorações com e sem casos de peeira apresentaram um valor absoluto reduzido e bastante aproximado (respetivamente 3,96 e 3,58 mm/m<sup>2</sup>). Assim, compreende-se que um potencial episódio de pluviosidade que decorra no mês mais seco será suficiente para alterar o resultado desta variável, atestando a sua volatilidade.

O modelo nº 2 também apresenta uma boa capacidade de explicar a presença/ausência de peeira nas explorações, tendo exibido alguns atributos favoráveis. De facto, foi este o modelo que apresentou um critério de *Schwarz* mais reduzido, devido à capacidade explicativa baseada num menor número de variáveis, bem como um índice de especificidade mais elevado. Segundo este modelo, as variáveis que possuem cumulativamente uma maior capacidade explicativa sobre a presença ou ausência de peeira nas explorações de ovinos no Alentejo são a *B06* (*Temperatura mínima no mês mais frio*), a *B13* (*Precipitação no mês mais húmido*) e a *B14* (*Precipitação no mês mais*

*seco*). A interpretação dos seus parâmetros indicia que a probabilidade de ocorrência da doença aumenta quando a variável *B06* apresenta valores mais reduzidos (apesar de não evidenciar significância estatística) e quando as variáveis *B13* e *B14* exibem valores mais elevados, em conformidade com a tendência já identificada na análise univariada. Deste modo, o presente modelo pode ser considerado como aquele que, em termos climáticos, mais facilmente justifica as alterações na variável dependente.

Atendendo por fim aos resultados obtidos na análise de agregados espaciais, apenas foi possível identificar o foco localizado no concelho de Montemor-o-Novo como aquele que apresenta significância estatística na análise. As explorações integradas neste *hotspot*, numa área circular com um raio aproximado de 18 km, apresentam uma probabilidade 12 vezes superior de apresentarem casos de peira, comparativamente com as restantes explorações do Alentejo. Para tentar descortinar a justificação para esta situação procedemos à comparação entre os valores das biovariáveis obtidos nas explorações incluídas neste *hotspot* (n=33) e os valores médios obtidos nas explorações sediadas nas restantes áreas (n=612). Apesar de se registarem diferenças estatisticamente significativas em muitas das variáveis analisadas, as diferenças mais expressivas ocorreram precisamente naquelas que avaliam a dinâmica da pluviosidade. Ora, as sete variáveis pluviométricas revelaram uma diferença estatisticamente significativa no sentido positivo, sendo que em todas elas a diferença supera os 10 pontos percentuais (Tabela 4.20).

Tabela 4.20 – Diferença entre médias, comparando a região de Montemor-o-Novo com o resto da região Alentejo, para as variáveis relativas à precipitação

Biovariáveis	Alentejo	Montemor	Diferença		Valor p
			IC 95%	Var. (%)	
<i>B12</i>	597,9	670,4	[63,03; 99,97]	+ 12,1 %	< 0,001
<i>B13</i>	98,3	108,1	[7,63; 11,99]	+ 10,0 %	< 0,001
<i>B14</i>	3,7	4,6	[0,61; 1,36]	+ 26,9 %	< 0,001
<i>B16</i>	262,8	293,9	[24,46; 37,7]	+ 11,8 %	< 0,001
<i>B17</i>	27,9	30,9	[1,02; 5,04]	+ 10,9 %	< 0,01
<i>B18</i>	33,9	38,2	[2,06; 6,46]	+ 12,6 %	< 0,001
<i>B19</i>	247,4	279,6	[25,52; 38,92]	+ 13,0 %	< 0,001

Legenda: Var. (%) – Variação percentual

Esta situação confirma que na área circundante a Montemor-o-Novo regista-se uma precipitação ao longo do ano que supera claramente os valores médios verificados na restante região Alentejo. Esta tendência vem ao encontro daquilo que vem sendo experienciado por vários produtores que detêm herdades na área em questão, tendo sido reportada a existência de um microclima bastante particular junto à Serra do Monfurado, o que justifica o registo de desigualdades tão marcadas relativamente às áreas confinantes. A referida serra localiza-se numa zona de separação entre as bacias hidrográficas do Sado e do Tejo, ocupando uma dimensão aproximada de 23946 ha e atingindo uma altitude máxima de 420 metros (Esgalhado *et al.*, 2020), sendo assim

facilmente destacável da envolvente dominada pela planura alentejana. A propósito deste microclima em concreto, os autores referem que a precipitação anual acumulada nesta área chega a atingir os 900 mm/m<sup>2</sup>. Este valor contrasta significativamente com aqueles que foram recolhidos nas 645 explorações, já que o valor máximo obtido para a variável *B12 (Precipitação anual)* foi de 762,8 mm/m<sup>2</sup>. Esta particularidade poderá contribuir para explicar a influência deste microclima que parece revelar-se crucial na expressão da doença.

Apesar de apenas ter sido identificado um local de agregação de explorações com peira, não podemos descurar que foram reconhecidos outros seis potenciais focos, os quais estão sediados nos concelhos de Almodôvar, Avis, Barrancos, Nisa, Odemira e Portalegre. Apesar de estes não terem apresentado significância estatística, não nos podemos esquecer que alguns deles revelaram mesmo uma prevalência de 100%. Todavia, a reduzida dimensão da amostra recolhida em cada um desses focos não permitiu sustentar a hipótese de serem considerados verdadeiros *hotspots* para a presença da doença. Ainda assim acreditamos que com recurso a uma amostragem mais extensa poderiam ser identificados outros focos que não apenas aquele que se localiza no concelho de Montemor-o-Novo.

#### **4.5 – Conclusão**

Tanto quanto é do nosso conhecimento, este trabalho foi pioneiro na avaliação do impacto que os fatores bioclimáticos desempenham na probabilidade de ocorrerem casos de peira em explorações de ovinos no Alentejo. Os resultados fornecidos pelas bases de dados que analisam os elementos edafoclimáticos conferem uma importante ferramenta analítica para a caracterização das diferentes áreas geográficas. O cruzamento desses dados com a localização onde estão instaladas as explorações pecuárias demonstram claramente que os fatores ambientais precipitação e temperatura influenciam de forma significativa a probabilidade de ocorrência de peira em explorações de ovinos do Alentejo.

Por outro lado, no caso das variáveis relacionadas com a tipologia dos solos, não foi possível identificar o mesmo tipo de correlação estatística que havia sido detetada para os fatores climáticos. Todavia, para que possamos confirmar que o tipo de solo não desempenha um papel tão relevante como aquele que já foi identificado em estudos efetuados em outros contextos geográficos, seria necessário a realização de estudos complementares. Neste sentido, o eventual recurso a amostras diretas sobre a efetiva composição dos solos das diferentes explorações, e a subsequente determinação dos seus parâmetros analíticos, forneceria informação mais precisa e tornaria mais robustos os resultados obtidos.

Este estudo evidencia de forma clara a relevância da análise espacial na determinação de localizações geográficas que são mais favoráveis para a expressão clínica da doença nas explorações do Alentejo, tal como verificámos no caso de Montemor-o-Novo. A metodologia que ancorou a análise revelou-se adequada aos objetivos previstos, como sejam a estimativa de probabilidades que permitam identificar áreas com maior suscetibilidade de a doença se poder manifestar.

Deste ponto de vista, ao permitir a identificação de localizações mais expostas ao risco de manifestação da doença, a adequada calibragem desta metodologia e o acesso a dados específicos sobre as condições ambientais e geológicas das unidades produtivas constituirá um passo relevante para dispormos de uma potente ferramenta nas ações tendentes ao controlo da peeira. Tal prática permitirá que a canalização de recursos para o combate à doença nessas localizações específicas seja feita com maior racionalidade e eficácia.

Não obstante os resultados prometedores deste estudo preliminar e seminal, será recomendável a realização de estudos subseqüentes com maior detalhe e com recurso a amostras de maior dimensão, os quais deverão contribuir para a identificação de outras localizações que podem também constituir-se como *hotspots* para o desenvolvimento e para a disseminação da doença na região.

## **Capítulo 5 – Caracterização clínica da peeira ovina em explorações do Alentejo**

### **5.1 – Introdução**

A peeira é uma doença que afeta as extremidades distais dos membros dos ovinos, sendo a causa mais relevante de claudicação nesta espécie. Uma vez que se trata de uma afeição bastante contagiosa, a proporção de animais infetados poderá ser bastante elevada, manifestando-se de forma expressiva ao nível do bem-estar animal, bem como num significativo impacto económico nas explorações que lidam com esta problemática (Green & George, 2008; Bennett & Hickford, 2011).

A bactéria *D. nodosus*, que corresponde ao verdadeiro agente etiológico da peeira, pode atuar como agente primário na colonização do espaço interdigital dos membros, sendo reconhecido que determinadas condições, relacionadas com o ambiente ou com algumas características do próprio animal, podem favorecer a ação da referida bactéria (Raadsma & Egerton, 2013). De facto, há várias décadas que é reconhecido que as condições ambientais desempenham um papel-chave na dinâmica de transmissão da peeira (Beveridge, 1941), desempenhando os teores de humidade e a temperatura ambiente um papel decisivo na expressão clínica da doença (Abbott & Lewis, 2005).

Numa fase inicial, a evolução clínica da doença poderá limitar-se a um mero processo inflamatório localizado no espaço interdigital. Todavia, se a lesão evoluir para fases mais severas, poderá ocorrer o destacamento da úngula das estruturas adjacentes (Bennett & Hickford, 2011; Gelasakis *et al.*, 2019). Este processo de separação irá propiciar o aparecimento de uma cavidade entre os tecidos sensitivos e córneos da própria úngula. Assim, esse espaço acabará por ser preenchido por uma secreção espessa de coloração acinzentada, a qual emana um odor putrefacto resultante da atividade bacteriana anaeróbia (Green & George, 2008).

A intensidade da manifestação clínica desta doença não resulta unicamente da virulência dos agentes bacteriológicos envolvidos, dependendo também das condições ambientais e dos fatores que determinam a resistência do hospedeiro (Green & George, 2008). No que se refere aos fatores ambientais, estes já foram abordados de forma detalhada nos Capítulos 3 e 4, pelo que aqui faremos apenas uma breve referência aos mesmos.

Começando por referir os fatores climáticos, a literatura empírica tem atestado que valores de precipitação e de temperatura elevados estão associados a um aumento da possibilidade de expressão da doença (Graham & Egerton, 1968; Ghimire & Egerton, 1996; Abbott & Lewis, 2005; Raadsma & Egerton, 2013). No que se refere às

características dos solos, aqueles que estejam associados a uma menor capacidade de drenagem costumam constituir um relevante fator de risco (Muzafar *et al.*, 2016). Também as áreas de baixa altitude, em que mais facilmente se acumula a água resultante da pluviosidade, são associadas a uma maior probabilidade de ocorrência de lesões de peira (Angell *et al.*, 2018). Por um motivo diferente, também os solos que propiciem a ocorrência de traumatismos nos dígitos, seja pela presença de restolho grosseiro ou devido à existência de terrenos pedregosos, podem constituir um fator de risco, uma vez que qualquer ação traumática poderá criar uma porta de entrada, facilitando a colonização pelo agente etiológico da doença (Angell *et al.*, 2018).

No que respeita aos fatores relacionados com a exploração e com o seu manejo, podemos resumir que todas as condicionantes que levem ao aumento da densidade animal poderão constituir potenciais fatores de risco, tal como acontece nas explorações que recorrem à estabulação dos respetivos animais, ou naquelas que têm efetivos de grande dimensão (Green & George, 2008). Neste último caso, e particularmente nas situações de pastoreio extensivo, será mais difícil identificar e tratar de forma precoce os animais quando estes exibam os primeiros indícios de claudicação (Raadsma & Egerton, 2013; Angell *et al.*, 2018), o que propiciará o aumento da incidência de peira na exploração, devido à elevada contagiosidade desta doença (Beveridge, 1941; Bennett & Hickford, 2011).

As estratégias de tratamento e prevenção da doença são variadas e dependem de uma multiplicidade de fatores. Focalizando a atenção nas opções mais frequentes para controlar a peira, destacamos a antibioterapia, o corte corretivo das úngulas, a utilização do pedilúvio, a vacinação, a quarentena, a separação dos animais afetados ou o refúgio dos animais cronicamente infetados (Winter, 2009; Dhungyel *et al.*, 2014; Green & Clifton, 2017; Winter & Green, 2017). Ainda assim, estas estratégias não exibem todas o mesmo efeito benéfico, sendo de referir que algumas das alternativas mais recorrentes ao longo das últimas décadas são claramente desaconselhadas na atualidade, devido às evidências científicas que sustentam os seus efeitos prejudiciais na manifestação da doença (Green & Clifton, 2017).

No que respeita especificamente aos fatores relacionados com a resistência do hospedeiro, também tem sido avançada a possibilidade de haver uma predisposição racial para a peira, sendo que, por exemplo, a raça merina é uma das que apresenta maior vulnerabilidade (Emery *et al.*, 1984). Quanto ao sexo dos animais, os carneiros costumam ser mais afetados do que as ovelhas (Raadsma & Egerton, 2013), enquanto a análise do fator idade revela que os ovinos mais velhos apresentam uma probabilidade superior de estarem infetados, comparativamente com os mais jovens (Nieuwhof *et al.*, 2008; Angell *et al.*, 2018).

Tendo em conta que estamos a abordar uma doença que tem revelado um grande dinamismo na forma como evolui (Smith *et al.* 2014), tem-se verificado ao longo das

últimas décadas a necessidade de avaliar as lesões segundo padrões objetivos. Deste modo, têm sido elaborados diversos sistemas de classificação com o intuito de caracterizar de forma tão uniforme quanto possível os diferentes patamares em que a afeição se pode expressar.

O trabalho pioneiro neste domínio deve-se a Egerton & Roberts (1971), tendo os autores construído uma escala que contempla cinco níveis de graduação da doença, em que o primeiro se refere a uma condição fisiológica e os restantes a situações patológicas. Esta escala foi concebida a partir de observações registadas em ovinos de raça merina. Apesar deste sistema já ter sido criado há algum tempo, os critérios refletidos nessa escala prosseguem a ser considerados como válidos, continuando a ser utilizados em estudos recentes, permitindo caracterizar de forma eficiente o estágio evolutivo das lesões de peeira. Adicionalmente, esta escala tem sido caracterizada por permitir uma elevada repetibilidade dos resultados, mesmo que a classificação seja executada por diferentes operadores (Conington *et al.*, 2008). Outro sistema, que também tem vindo a ser amplamente utilizado em ensaios experimentais que recorrem à categorização de lesões de peeira, foi desenvolvido por Stewart & Claxton (1993). Embora esta escala apresente semelhanças com a anterior, há uma diferença significativa que reside no facto de contemplar um maior número de escalões, o que permite repartir ainda mais as fases evolutivas.

Com o propósito de classificar de forma mais homogénea as diferentes manifestações clínicas de peeira ao nível de cada exploração, foram criadas determinadas classificações que permitem diferenciar a forma como a doença se expressa em cada efetivo ovino. Assim, cada estatuto clínico de peeira é regido por diferentes limites, os quais são definidos de acordo com as observações realizadas em rebanhos de ovinos presentes em cada área geográfica específica. De acordo com este princípio, Raadsma & Egerton (2013) classificaram as formas de peeira em benigna, intermédia ou virulenta, enquanto Frosth *et al.* (2015) apresentaram uma taxonomia de quatro níveis, em que os dois primeiros se referem a situações que ainda não se enquadram na clínica da peeira, enquanto os outros dois já retratam efetivamente a expressão da doença. Da aplicação destas classificações em momentos distintos poderá resultar a atribuição de diferentes estatutos clínicos. Nesta situação, deverá ser outorgado o grau mais elevado, uma vez que a expressão mais grave da doença poderá, em determinadas circunstâncias, encontrar-se dissimulada pela presença de efeitos ambientais inibitórios ou devido à aplicação de tratamentos prévios (Raadsma & Egerton, 2013).

Em suma, a aplicação de critérios homogéneos a adotar no rastreio da doença nas várias unidades pecuárias é um elemento importante para aferir a dimensão adquirida pela doença e o seu grau de severidade, o que é crucial para uma correta atribuição dos respetivos estatutos clínicos e da consequente estratégia de combate. Ora, tanto quanto é do nosso conhecimento, nunca um ensaio com observação clínica direta tinha sido

realizado com o intuito de caracterizar as lesões de peeira ao nível das explorações de ovinos no Alentejo. Assim, o propósito do estudo desenvolvido neste capítulo é aplicar um método de classificação de lesões desta doença num conjunto de explorações, o que permitirá: a) avaliar o padrão de distribuição das lesões; b) identificar fatores de risco relacionados com os hospedeiros; c) avaliar a importância dos fatores climáticos na expressão da doença; d) identificar fatores de risco ao nível do manejo da exploração; e) estimar a prevalência da doença nessas explorações; f) atribuir um estatuto clínico de peeira a cada exploração.

## 5.2 – Metodologia

### 5.2.1 – Seleção das explorações

Os *Inquéritos Epidemiológicos* recolhidos e que suportaram a análise realizada nos dois capítulos anteriores serviram como base para a identificação e seleção das explorações que foram incluídas nesta fase da pesquisa e que, conseqüentemente, foram objeto das visitas por parte da nossa equipa operacional. Foram assim selecionadas 17 explorações de ovinos localizadas no Alentejo, que integravam o universo das 689 explorações que responderam ao *Inquérito Epidemiológico*, o qual tinha sido concebido com o propósito de estimar a prevalência de peeira em explorações de ovinos naquela região (Capítulo 3). Os critérios aplicados e que suportaram a seleção de cada uma destas explorações foram os seguintes:

- Ter registado a ocorrência de casos clínicos de peeira, pelo menos nos dois anos anteriores;
- Possuir um efetivo pecuário com uma população não inferior a 100 ovinos;
- Os ovinos pertencerem a raças autóctones, ou resultante de cruzamentos com elas;
- Não ter realizado tratamentos de grupo direcionados para a peeira no período de 30 dias que antecederam as visitas à exploração;
- Manifestação de efetiva disponibilidade pelo produtor em colaborar com as atividades que se revelassem necessárias.

Apesar de os dados recolhidos nos referidos *Inquéritos Epidemiológicos* terem servido como base para a referida seleção, houve o cuidado de, antes de se proceder à escolha definitiva das explorações alvo, realizar contactos com os médicos veterinários assistentes das mesmas. Naturalmente que a finalidade de tais contactos foi aferir, na opinião destes agentes qualificados, quais as unidades pecuárias que dispunham de condições operacionais para o desenvolvimento das atividades incluídas no estudo.

Outro dos critérios utilizado para definir o conjunto de herdades que iriam ser consideradas neste projeto foi escolher um lote de explorações que garantisse uma adequada cobertura territorial da região Alentejo no seu todo. Aplicados estes procedimentos, foram definitivamente escolhidas as explorações, cujos dados apresentamos na Tabela 5.1. O referido quadro sintetiza os elementos relativamente à sua localização geográfica, como sejam os concelhos e as respetivas freguesias em que se inserem. De modo a transmitir com maior precisão a localização de cada unidade pecuária, considerámos o mapeamento das freguesias correspondente ao período prévio à reorganização administrativa que ocorreu em 2013 em Portugal<sup>15</sup>. A Figura 5.1 apresenta a localização geográfica precisa das explorações incluídas no estudo.

*Tabela 5.1– Localização, ao nível do concelho e da freguesia, das 17 explorações visitadas*

<b>Exploração</b>	<b>Concelho</b>	<b>Freguesia</b>
A / B	Serpa	Vila Nova de São Bento
C	Castro Verde	Entradas
D	Portalegre	Urra
E	Portel	Portel
F	Alandroal	Terena
G	Évora	Malagueira
H	Almodôvar	Aldeia dos Fernandes
I	Montemor-o-Novo	Ciborro
J	Ponte de Sor	Tramaga
K	Ferreira do Alentejo	Canhestros
L	Alvito	Vila Nova da Baronia
M	Odemira	Colos
N	Fronteira	Fronteira
O	Évora	Canaviais
P	Moura	Sobral da Adiça
Q	Ponte de Sor	Galveias

Relativamente às unidades pecuárias designadas por A e B, em termos práticos correspondem a uma única exploração. Todavia, em virtude de se encontrarem separadas do ponto de vista administrativo, em função das raças a que os ovinos pertencem, resolvemos considerá-las como unidades distintas para efeitos de análise. Todos os animais desta unidade pecuária encontram-se registados no Livro Genealógico das raças merina preta (A) e merina branca (B).

<sup>15</sup> Conforme a Lei n.º 11-A/2013 – Diário da República n.º 19/2013.

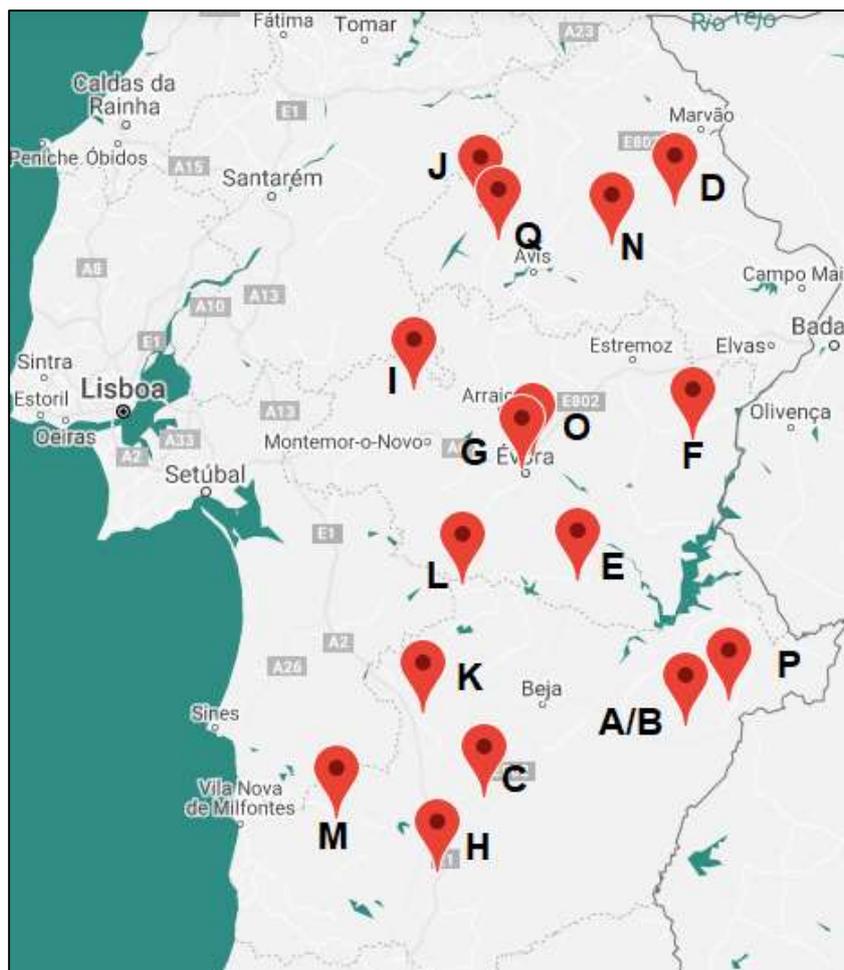


Figura 5.1 – Localização geográfica das 17 explorações visitadas

Referimos ainda que tinha sido selecionada uma 18ª exploração para integrar o estudo, tendo mesmo sido efetuada a 1ª visita da equipa técnica, procedendo-se então à recolha de elementos relativos a 108 ovinos. Contudo, o proprietário da unidade em causa decidiu cancelar a sua participação neste estudo, pelo que conseqüentemente a unidade foi suprimida da avaliação. A referida herdade localiza-se no concelho de Grândola, pelo que a sua inclusão no estudo procurava assegurar uma maior representatividade da sub-região Alentejo Litoral na amostra global.

### 5.2.2 – Visitas às explorações

As visitas técnicas efetuadas às explorações pecuárias decorreram em dois anos consecutivos, sendo que no primeiro ano foram avaliadas dez explorações e no segundo ano as restantes sete. Foram realizadas duas visitas a cada exploração, sendo cada uma delas espaçada, em média, por um período de 77 dias, tal como podemos observar na Tabela 5.2. O agendamento das visitas não cumpriu uma rotina tão uniforme quanto

seria desejável, uma vez que foi necessário conjugar a disponibilidade dos produtores, devido a intervenções relacionadas com o manejo e com o planeamento reprodutivo de cada exploração, bem como com a necessidade de desfasamento de condições meteorológicas adversas, que inviabilizassem o trabalho de campo.

Tabela 5.2 – Datas em que foram realizadas as visitas às 17 explorações

Exp.	1ª Visita	2ª Visita	Intervalo (dias)
A	06/12/2016	09/03/2017	93
B	06/12/2016	09/03/2017	93
C	20/12/2016	26/01/2017	37
D	27/12/2016	05/05/2017	129
E	04/01/2017	23/03/2017	78
F	09/01/2017	19/04/2017	100
G	11/01/2017	07/03/2017	55
H	16/01/2017	14/03/2017	57
I	18/01/2017	04/04/2017	76
J	24/01/2017	30/03/2017	65
K	15/01/2018	03/04/2018	78
L	23/01/2018	19/04/2018	86
M	08/02/2018	08/05/2018	89
N	20/02/2018	23/04/2018	62
O	27/02/2018	03/05/2018	65
P	13/03/2018	11/06/2018	90
Q	27/03/2018	16/05/2018	50
<b>Média</b>			<b>76,7</b>

Legenda: Exp. – Exploração

A decisão relativa ao início das visitas em cada ano foi determinada pela ocorrência de alguma precipitação e, ainda, pelo relato por parte dos produtores de que tinham começado a observar ovinos com sinais de claudicação, situação presumivelmente derivada da infeção por *D. nodosus*. Assim, as visitas no primeiro ano de trabalho decorreram entre dezembro de 2016 e maio de 2017, enquanto no ano seguinte as explorações remanescentes foram visitadas no período compreendido entre janeiro e junho de 2018 (Tabela 5.2).

Em cada uma das explorações foram selecionados, de forma aleatória, cerca de 100 animais, sendo que o objetivo planeado consistia na observação de cada um deles em dois momentos distintos, de forma a poder avaliar o efeito da evolução temporal registada pelas lesões de peira observadas. Todavia, devido à natureza dinâmica das explorações de animais de produção, tornou-se impossível reanalisar sempre o mesmo conjunto de animais. Assim, não foi possível monitorizar com rigor a evolução da doença exatamente nos mesmos animais, já que a coincidência nas amostras das duas visitas não foi plena. Diversos e justificados motivos contribuíram para tal, mormente o registo de casos de refugo, morte, participação em feiras ou, ainda, a mudança de lote devido

a questões relacionadas com o tipo de manejo reprodutivo instituído. Deste modo, foram contemplados na segunda avaliação alguns animais que ainda não tinham sido observados e classificados anteriormente, pelo que nestes casos não foi possível analisar a evolução da doença.

Em cada uma das explorações visitadas foi usado um impresso próprio (Anexo 4) que permitiu que se procedesse aos registos de forma sistemática, a fim de permitir posteriormente o adequado tratamento estatístico dos dados. A pessoa responsável pelo registo destas informações foi sempre a mesma, por forma a minorar a hipótese de registo dos dados segundo diferentes critérios. Assim, a bateria de dados registados sobre cada ovino, e em cada visita, incluiu:

- Número de brinco do Sistema de Identificação Animal (SIA);
- Sexo;
- Idade;
- Raça;
- Estado produtivo (no caso das fêmeas);
- Condição corporal (Escala de 1–5 utilizada nos trabalhos de Kenyon *et al.* (2014));
- Classificação lesional (Escala de 0–4, segundo Egerton & Roberts (1971)).

A data de nascimento de cada animal foi conhecida a partir da base de dados disponibilizada pelo IFAP, tendo ainda sido observada a dentição de cada indivíduo para averiguar a sua compatibilidade com a idade indicada no referido registo.

No que respeita especificamente à raça dos ovinos, foram verificados os animais registados nos livros genealógicos das raças merina preta e merina branca. Quanto aos restantes animais, e uma vez que o conhecimento sobre o seu historial era insuficiente para uma classificação credível, foi decidido denominá-los como *tipo merino*, quando as características fenotípicas indicassem que pudesse ter existido uma linha ancestral baseada na raça merina. Aos restantes animais foi atribuída a designação *raça cruzada*.

Sempre que foi possível obter informação segura sobre o estado produtivo das fêmeas analisadas procedeu-se à sua inclusão numa das seguintes categorias:

- **Pós-parto** – quando o parto já tenha ocorrido, e a ovelha se encontre em período de lactação;
- **Alfeira** – sempre que, após a época de partos, uma ovelha não esteja a criar nenhum borrego, quer seja por não ter ficado gestante ou por ter deixado de criar o(s) borrego(s);

- ***Pós-desmame/gestante*** – sempre que uma fêmea esteja, ou tenha estado, num lote que inclua carneiros, com o propósito de cobrição. A ovelha poderá estar ou não gestante.

Será importante referir que no lote *Pós-desmame/gestante* não foi avaliada qualquer ovelha que estivesse próxima da data prevista para o parto, por forma a evitar situações de *stress* associadas à manipulação dos animais.

### 5.2.3 – Inspeção dos dígitos e classificação das lesões de peira

No procedimento aplicado para a observação clínica dos animais, estes foram contidos e colocados na posição de decúbito dorsocaudal, utilizando-se um tronco revirador de ovinos (modelo *Kwik Sheep Turnover Crate IAE®*) para tal finalidade (Figura 5.2).



Figura 5.2 – Tronco de contenção utilizado para classificação das lesões de peira (Fonte: Olifants LBA/ ACOS)

A verificação das extremidades distais dos ovinos foi precedida por uma lavagem das úngulas com um pulverizador com água (Figura 5.3), por forma a remover a maioria da conspurcação presente. Posteriormente procedeu-se a cuidadosa separação das úngulas, por forma a visualizar minuciosamente todas as estruturas dos dígitos (Figura 5.4). Foi dada relevância à observação do espaço interdigital e do bordo coronário dos dígitos, neste caso para detetar a possibilidade de separação do casco (*underrunning*). O corte corretivo das úngulas, mesmo nos casos em que se notou um sobrecrescimento do estrato córneo, não foi realizado, por forma a prevenir a existência de qualquer influência iatrogénica no curso evolutivo da lesão.



Figura 5.3 – Lavagem das úngulas com pulverizador  
(Fonte: Olifants LBA/ ACOS)



Figura 5.4 – Observação minuciosa das úngulas do ovino (Fotografia original)

Deste modo, os quatro membros de cada animal foram cuidadosamente inspecionados, tendo sido classificada a severidade da doença de acordo com a taxonomia desenvolvida por Egerton & Roberts (1971):

- **Grau 0** – ausência de qualquer lesão, devendo ser observável o espaço interdigital com uma coloração ligeiramente rosada, apresentando-se seco e coberto por uma camada de pelo;
- **Grau 1** – corresponde a lesão de dermatite interdigital pouco severa, podendo ser observada alopecia e a presença de eritema;
- **Grau 2** – equivale a uma lesão de dermatite interdigital mais extensa, sendo a imagem semelhante ao grau 1, mas já se distinguem sinais de alguma necrose no espaço interdigital;
- **Grau 3** – quando a lesão deixa de estar confinada ao espaço interdigital, começando a existir sinais de destacamento da úngula na sua porção medial e na zona dos talões;
- **Grau 4** – lesão idêntica à do grau 3, mas onde a separação da úngula já se estende até à porção anterior da parede abaxial.

As Figuras 5.5 a 5.9 referem-se a extremidades distais de membros de ovinos que foram classificados com os diferentes *scores* lesionais definidos por Egerton & Roberts (1971). Todas as imagens foram recolhidas no decurso deste trabalho.



Figura 5.5 – Imagem representativa do score 0 (Fotografia original)

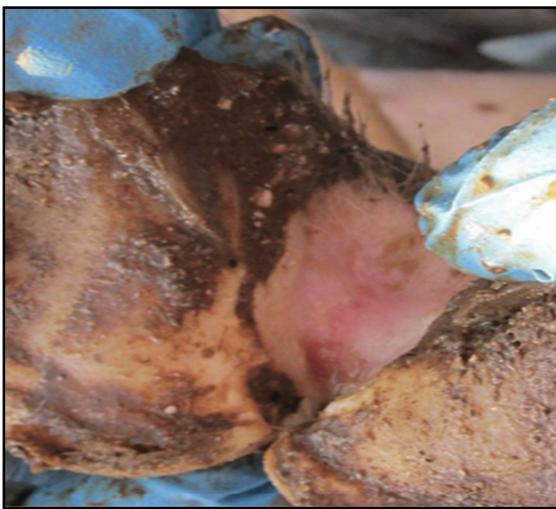


Figura 5.6 – Imagem representativa do score 1 (Fotografia original)



Figura 5.7 – Imagem representativa do score 2 (Fotografia original)



Figura 5.8 – Imagem representativa do score 3 (Fotografia original)



Figura 5.9 – Imagem representativa do score 4 (Fotografia original)

A escala de Egerton & Roberts (1971) tem uma elaboração bastante simples, tendo-se revelado muito eficiente desde que foi concebida, já que é dotada de um elevado grau de repetibilidade mesmo quando aplicada por diferentes analistas. Deste modo, o referido sistema continua a ser profusamente utilizado para categorizar as lesões de peira desde há várias décadas (Conington *et al.*, 2008). As lesões foram classificadas por três médicos veterinários, dois dos quais exercem a sua atividade na área clínica de animais de produção e a terceira é uma patologista veterinária. Deste modo, os técnicos que procederam à análise das lesões estavam devidamente familiarizados com este sistema de classificação, possuindo experiência e formação que os habilitava a aplicar devidamente o procedimento descrito. Adicionalmente, antes do início das visitas às explorações, todos os elementos da equipa frequentaram uma ação de formação prática, onde foram classificados vários animais pertencentes a uma amostra experimental. Nesta sessão foi possível definir claramente todos os procedimentos e critérios a utilizar, facto que permitiu garantir avaliações homogéneas e naturalmente credíveis nos seus resultados.

Apesar de o grau 1 da escala desenvolvida por Egerton & Roberts (1971) já se referir a uma situação patológica, nomeadamente a uma lesão de dermatite interdigital pouco severa, os ovinos só são considerados como estando afetados por peira se apresentassem pelo menos um membro com *score* superior ou igual a 2, critério esse que já tinha sido utilizado por Abbott (2000).

As classificações atribuídas aos quatro membros foram registadas com recurso sempre à mesma sequência, por forma a minimizar a possibilidade de ocorrência de erros de registo em impresso próprio (Anexo 4). A ordem definida tanto para observação dos membros, como para a sua anotação foi sempre:

1. membro anterior direito (MAD);
2. membro anterior esquerdo (MAE);
3. membro posterior direito (MPD);
4. membro posterior esquerdo (MPE).

#### **5.2.4 – Recolha de amostras**

Foi recolhida uma amostra sanguínea para um tubo de colheita com EDTA-K, através de punção venosa da veia jugular. Esta colheita de sangue em cada animal avaliado teve como propósito a determinação do hematócrito e a respetiva quantificação do nível de proteínas totais existentes no soro sanguíneo. As subseqüentes análises foram realizadas em contexto laboratorial e após centrifugação das amostras sanguíneas, decorrendo no período temporal das primeiras 24 horas após a respetiva colheita.

Ainda procedemos à recolha de outra tipologia de amostras, nomeadamente fragmentos cutâneos dos espaços interdigitais que foram obtidos pela técnica de

biópsia. O propósito desta colheita foi caracterizar os agentes microbiológicos presentes, nomeadamente no que se refere aos agentes *D. nodosus* e *F. necrophorum*. Esta temática será alvo de debate detalhado no Capítulo 6.

### **5.2.5 – Obtenção de dados referentes aos fatores climáticos**

Relativamente às condicionantes climáticas, considerámos pertinente avaliar os fatores precipitação e temperatura média diária registados na área das herdades, nos intervalos temporais que antecederam as visitas. De acordo com Graham & Egerton (1968), a precipitação acumulada verificada no período das seis semanas que antecedem a observação do animal, é o mais relevante para a expressão clínica de peeira. Assim, utilizámos uma metodologia idêntica à já apresentada no Capítulo 4, tendo sido extraídos da plataforma *E-Obs gridded dataset* os valores de precipitação diária e de temperatura média diária ao longo dos 42 dias que antecederam cada visita às explorações. Foram então criadas duas variáveis, em que a *precipitação acumulada* resultou da soma algébrica desses 42 registos de pluviosidade, e a *temperatura média* foi calculada através da média aritmética dos valores de temperatura média recolhidos nesse período.

### **5.2.6 – Análise de dados**

Os dados recolhidos foram registados e processados com recurso aos programas informáticos de análise de dados *IBM SPSS Statistics (version 26)* e *Gretl (version 1.1)*. Para as análises realizadas foram considerados quatro diferentes níveis de confiança, sendo eles 90, 95, 99 e 99,9%. Dependendo do objetivo de cada análise específica, a distribuição das lesões foi avaliada segundo os testes Z ou do *Qui-quadrado*, tendo sido também calculados os diferentes indicadores de estatística descritiva, onde se destacam os valores de OR e do respetivo IC. No que se refere à modelação dos dados, foram construídos modelos de regressão não linear (*logit*) e linear (método dos mínimos quadrados) sempre que tal se justificou.

### **5.2.7 – Identificação de fatores de risco para a presença de lesões de peeira**

O cruzamento dos dados obtidos durante as visitas com as respostas aos *Inquéritos Epidemiológicos*, analisadas no Capítulo 3, permitiu construir um modelo multivariado, contemplando um conjunto considerável de variáveis. O procedimento de articular no mesmo modelo variáveis individuais e outras de natureza coletiva para prever a probabilidade de ocorrência de lesões de peeira em ovinos já havia sido utilizado no

trabalho de Angell *et al.* (2018). Mais uma vez decidimos eleger o modelo *logit*, uma vez que este permite investigar a existência de potenciais associações entre diversas variáveis independentes de forma simultânea. Assim, desenvolvemos e calbrámos um modelo em que a variável resposta é discreta e binária, correspondendo as duas opções à presença ou ausência de lesões de peira em cada observação. Neste modelo foram consideradas diversas variáveis explicativas, englobando características individuais e atributos comuns a todos os animais de cada exploração. Nesta última situação, as variáveis foram repartidas pelas que estão relacionadas com a própria exploração, com o tipo de manejo praticado, com as opções terapêuticas/profiláticas implementadas e, ainda, com as condições climáticas efetivamente verificadas.

De forma similar ao verificado no Capítulo 3, o procedimento implementado teve por base uma estratégia de eliminação regressiva, começando com um modelo inicial com um elevado número de variáveis independentes, as quais vão sendo gradualmente retiradas, tendo por base o critério de rejeição dos valores p mais elevados no teste t assintótico. Os detalhes deste processo de modelação encontram-se discriminados na Secção 3.2.6 deste trabalho.

Num primeiro momento foram incluídas 35 variáveis, mas devido a questões relacionadas com a existência de colinearidade entre as diferentes variáveis, algumas tiveram de ser excluídas, desde logo. Deste modo, entre o conjunto de variáveis qualitativas binárias relacionadas com o manejo da exploração ou com as formas de prevenção/tratamento da doença, removemos aquelas em que 13 ou mais explorações forneceram uma resposta afirmativa, considerando as 17 unidades pecuárias desta análise. Esta foi a opção escolhida, uma vez que, após a adoção desta medida, os referidos problemas derivados de colinearidade entre variáveis ficaram desde logo resolvidos. Esta situação deveu-se, presumivelmente, ao facto de os atributos que eram partilhados pela grande maioria das explorações não permitirem proceder a uma diferenciação de forma conveniente entre as duas hipóteses de resposta para a variável dependente, ou seja, a presença ou ausência de lesões de peira em cada indivíduo.

Os critérios de definição das variáveis relacionadas com o manejo e com o tratamento e prevenção da peira foram apresentados no Capítulo 3, tendo sido os mesmos que considerámos nesta análise. As variáveis resultantes das condições climáticas que foram utilizadas neste modelo resultam das condições efetivamente registadas no período imediatamente anterior a cada visita (serão adiante apresentadas na Tabela 5.15). Por fim, as variáveis individuais relacionadas com os próprios animais são aquelas que discutiremos ao longo deste capítulo. Em suma, da aplicação dos procedimentos referidos, resultaram as 24 variáveis que foram apreciadas no modelo inicial e que se encontram resumidas na Tabela 5.3.

Tabela 5.3 – Variáveis incluídas no modelo multivariado inicial (n=24)

Categoria	Exploração	Prevenção e/ou Tratamento	Clima	Individuais
Variáveis	Área animais	Separação animais afetados	Precipitação	Idade
	Efetivo			Sexo (Macho)
	Caprinos			*Merina preta
	Bovinos			*Merina branca
	Caminhos partilhados	Vacina	Temperatura média	*Tipo merino
	Feira			Condição corporal
	Estabulação			
	Partos ovil			
	Regadio	Mudança camas		
	Solo argiloso			
	Pedras			
	Má drenagem			
	Baixa altitude			

Legenda: \* – Variáveis referentes à raça de cada animal

Como podemos constatar, entre os 24 fatores analisados, a maioria corresponde a variáveis qualitativas binárias, envolvendo uma resposta sim/não. Não obstante, existem também algumas variáveis quantitativas, quer contínuas (ex: *Área destinada aos animais*) quer discretas (ex: *Condição corporal*). No caso concreto da raça dos ovinos, recordamos que classificámos cada animal com uma de quatro hipóteses, sendo elas *merina preta*, *merina branca*, *tipo merino* e *cruzada*. Não foi possível incluir as quatro variáveis de forma simultânea, pois tratar-se-ia de um caso de colinearidade exata entre esses fatores. Deste modo, incluímos três delas, sendo que a raça cruzada não integra o modelo, mas servirá como base de comparação para as restantes. Ainda sobre os fatores individuais, optámos por não colocar no modelo qualquer variável relacionada com o estado produtivo, devido às questões relacionadas com alguma falta de rigor na atribuição das diferentes classes nesta categoria, tal como será adiante explicado.

Para a construção deste modelo foram tidas em conta todas as observações disponíveis para as variáveis consideradas, com base nas duas visitas realizadas a cada uma das explorações. Algumas observações apresentavam valores omissos para determinadas variáveis, tendo sido excluídas do modelo. O elevado número de observações contempladas determinou que apenas tivéssemos utilizado dois níveis de confiança, sendo eles 99 e 99,9%.

### 5.2.8 – Critérios de classificação para a análise

As análises apresentadas neste capítulo foram executadas tanto a nível individual (ovino) como a nível coletivo (rebanho). As duas subsecções seguintes detalham as pesquisas que foram efetuadas em cada um dos níveis.

#### 5.2.8.1 – Classificação ao nível do animal

Em termos de análise, foram criados dois conjuntos de dados diferenciados. O primeiro englobou todos os animais observados (n=1910), enquanto o outro considerou exclusivamente os ovinos que foram classificados em dois momentos distintos (n=1483), por forma a acompanhar a evolução dos graus lesionais.

Relativamente aos critérios utilizados para a análise das lesões de peeira, foram definidos vários conceitos, sendo que as diferentes classificações foram utilizadas em análises distintas. Ora, as distintas definições criadas foram as seguintes:

- **score máximo** – valor máximo entre os graus de lesão dos quatro membros;
- **score acumulado** – soma algébrica dos graus atribuídos para os quatro membros;
- **número de membros com lesões de peeira** – quantidade de membros que apresentam um *score* igual ou superior a 2;
- **ovino com lesão podal** – o animal apresenta pelo menos um membro com o *score* diferente de 0;
- **ovino com lesão de peeira** – o ovino exhibe um *score* máximo igual ou superior a 2;
- **ovino com lesão de peeira severa** – o animal evidencia um *score* máximo igual ou superior a 3;

#### 5.2.8.2 – Classificação ao nível da exploração

Relativamente à classificação das apresentações clínicas de peeira nas explorações, seguimos dois critérios distintos, comparando depois a sua concordância. O primeiro que aplicámos, designado por critério A, permite determinar se estamos perante situações de peeira benigna, virulenta ou intermédia (Raadsma & Egerton, 2013). Os padrões estabelecidos pelos referidos autores baseiam-se na estimação da percentagem de animais que apresentam cada *score máximo*, encontrando-se os valores limite de cada categoria expressos de forma simplificada na Tabela 5.4. Evidentemente que esta classificação só poderá ser seguida se tiver sido analisada uma amostra representativa de todo o efetivo.

Tabela 5.4 – Distribuição percentual dos scores máximos nas diferentes formas clínicas de peeira (segundo Raadsma & Egerton (2013) – Critério A)

Grau máximo	Forma benigna (%)	Forma intermédia (%)	Forma virulenta (%)
0	20 – 80	30 – 60	30 – 50
1	5 – 10	5 – 10	5 – 10
2	10 – 80	20 – 70	5 – 50
3	1 – 15	10 – 30	10 – 50
4	0 – 1	1 – 10	10 – 70

No caso de existirem explorações cuja distribuição de scores não tenha atingido os patamares previstos para a forma clínica menos severa, atribuímos à exploração a classificação *ausência de peeira*, segundo o padrão descrito por Raadsma & Egerton (2013).

O segundo critério aplicado seguiu o modelo definido por Frosth *et al.* (2015), critério esse que é bastante mais simples do que o anteriormente exposto. Assim, os autores construíram uma escala com quatro níveis, em que os dois primeiros retratam as explorações clinicamente saudáveis, enquanto os dois níveis superiores correspondem às explorações em que a peeira está efetivamente presente. A Tabela 5.5 apresenta então o critério definido por estes autores.

Tabela 5.5 – Estatuto clínico de peeira das explorações (segundo Frosth *et al.* (2015) – Critério B)

Categoria	Estatuto	Critério utilizado para a categorização das explorações
1	Sem peeira	Maioria dos animais com score 0 e nenhum com valor > 1
2		Maioria dos animais com score 1 e nenhum com valor > 1
3	Com peeira	Pelo menos um animal com score 2
4		Pelo menos um animal com score 3

## 5.3 – Resultados

### 5.3.1 – Caracterização da amostra selecionada

Os atributos de cada uma das explorações consideradas no ensaio, de acordo com as respostas fornecidas nos *Inquéritos Epidemiológicos*, revelaram que a área média das explorações ronda os 524 ha, correspondendo o valor médio efetivamente ocupado pelos ovinos a 362 ha. A dimensão média dos rebanhos em termos de efetivo adulto é de cerca de 528 animais (Tabela 5.6).

Tabela 5.6 – Estatísticas descritivas referentes às variáveis Área total, Área dos animais e Efetivo (n=17)

Variáveis	Unidade	Média	Mediana	Q1 – Q3	Mín – Máx	$\sigma$
Área total	ha	523,88	365	270 – 534	30 – 1514	454,33
Área animais	ha	361,71	280	100 – 447	30 – 900	293,87
Efetivo animal	Animais adultos	527,65	390	292 – 793	115 – 1200	338,72

As restantes características de cada exploração e as especificidades de cada estratégia de manejo encontram-se expostas na Tabela 5.7. Os critérios aqui considerados são idênticos aos que haviam sido apresentados na Secção 3.2.6. Podemos então constatar que os atributos mais frequentemente registados nas explorações visitadas foram a presença de áreas de montado (n=14) e a concentração das épocas de partos (n=13). No sentido oposto, as particularidades menos frequentemente registadas foram a partilha de caminhos entre animais de diferentes efetivos (n=2), a má drenagem dos terrenos (n=3) e a ocorrência dos partos dentro do ovil (n=3).

Tabela 5.7 – Presença/ausência dos atributos relacionadas com o manejo e com a própria exploração (n=17)

Variáveis	Explorações																	Quantidade
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	
Linhas puras	S	S	N	S	N	N	S	N	S	S	N	N	N	S	S	S	N	9
Cruzados	N	N	S	S	S	S	N	S	N	S	S	S	S	N	S	N	S	11
Caprinos coabitantes	S	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	S	N	S	N	4
Bovinos coabitantes	S	S	S	S	N	S	S	S	S	N	N	S	N	N	S	S	N	11
Partilha caminhos	N	N	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N	N	S	N	N	N	2
Participação feiras	S	S	N	S	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N	S	N	N	5
Estabulação	S	S	N	S	N	N	S	S	N	S	S	N	N	N	S	S	N	9
Partos no ovil	S	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N	N	3
Concentração partos	S	S	S	S	S	N	S	S	S	S	N	S	N	S	S	N	S	13
Regadio	S	S	N	N	N	N	N	N	S	S	N	N	N	N	N	N	S	5
Solo argiloso	S	S	S	N	S	S	N	N	S	N	S	S	S	S	N	N	N	10
Pedras traumáticas	S	S	S	N	S	N	N	N	N	N	S	N	S	N	N	N	N	6
Má drenagem	N	N	N	S	N	N	N	N	N	N	S	S	N	N	N	N	N	3
Baixa altitude	S	S	S	S	N	N	N	N	S	S	S	S	N	S	S	S	S	12
Montado	S	S	N	S	S	N	S	S	S	S	S	S	S	S	N	S	S	14

Legenda: N – Resposta “Não”; S – Resposta “Sim”; Quantidade – Número de explorações que responderam “Sim”

Analisando brevemente as ações preventivas e terapêuticas utilizadas especificamente para fazer face à peeira, verificamos que as ações utilizadas num maior número de explorações são a implementação do corte corretivo das úngulas (n=16), a passagem dos animais no pedilúvio (n=15) e a administração de antibióticos por via sistémica (n=15). No extremo oposto, verificamos que em nenhuma das 17 unidades pecuárias consideradas no nosso estudo se adotou a medida de quarentena nos novos animais, nem se procede ao tratamento das camas com substâncias desinfetantes. As respostas fornecidas por cada produtor encontram-se resumidas na Tabela 5.8.

Tabela 5.8 – Estratégias de prevenção e tratamento utilizadas em cada exploração (n=17)

Variáveis	Explorações																Quantidade	
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P		Q
<b>Pedilúvio</b>	S	S	S	S	S	N	S	S	S	S	S	S	S	S	S	N	S	15
<b>Podiatria</b>	S	S	S	S	S	N	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	16
<b>AB tópico</b>	S	S	S	S	S	N	S	S	N	N	S	S	S	S	S	S	S	14
<b>AB sistémico</b>	S	S	S	N	S	S	S	S	N	S	S	S	S	S	S	S	S	15
<b>Separação afetados</b>	S	S	S	S	N	S	S	S	N	S	S	N	N	S	N	S	S	12
<b>Vacina</b>	S	S	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N	S	N	4
<b>Mudança camas</b>	S	S	N	N	N	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N	N	N	3
<b>Tratamento camas</b>	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	0
<b>Quantidade</b>	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	0

Legenda: N – Resposta “Não”; S – Resposta “Sim”; Quantidade – Número de explorações que responderam “Sim”

Da aplicação da metodologia e dos procedimentos referidos para o universo das 17 explorações, resultou uma observação direta de um total de 1910 ovinos, sendo que em 1483 destes (77,6% do total) foi possível classificar as lesões nos dois momentos distintos que concretizaram as visitas. Como antes referido, os restantes 427 animais só foram considerados na 1ª ou na 2ª visita a cada exploração. As tabelas 5.9 e 5.10 registam o número de ovinos observados, distribuídos pelas explorações englobadas no estudo, considerando os dois anos em que se desenvolveu a pesquisa.

Tabela 5.9 – Número de ovinos inspecionados em cada exploração no 1º ano do estudo

Exp.	Duas observações	Uma observação		Total
		1ª Visita	2ª Visita	
A	83	13	2	98
B	96	7	8	111
C	93	77	1	171
D	49	91	0	140
E	104	7	0	111
F	102	13	6	121
G	50	46	1	97
H	94	16	3	113
I	76	25	3	104
J	56	48	3	107
<b>Total</b>	<b>803</b>	<b>343</b>	<b>27</b>	<b>1173</b>

Tabela 5.10 – Número de ovinos inspecionados em cada exploração no 2º ano do estudo

Exp.	Duas observações	Uma observação		Total
		1ª Visita	2ª Visita	
K	106	0	0	106
L	94	6	3	103
M	107	3	3	113
N	104	3	12	117
O	71	2	9	82
P	94	13	2	109
Q	104	1	0	105
<b>Total</b>	<b>680</b>	<b>28</b>	<b>29</b>	<b>737</b>

Entre os 1910 animais contemplados, a larga maioria correspondeu a fêmeas (97,8%), tendo sido observados apenas 42 carneiros. Apesar de o número de machos nos efetivos ser muito reduzido, comparativamente com a quantidade de fêmeas existente, a diferença verificada no nosso trabalho também poderá ser explicada pelo facto de em algumas situações não nos ter sido facultada a possibilidade de avaliar qualquer macho. De facto, muitas vezes os carneiros encontravam-se separados do restante rebanho, devido a questões relacionadas com o planeamento reprodutivo de cada exploração, sendo que por vezes nem estavam presentes na mesma herdade que as fêmeas.

No caso específico das fêmeas, o estado produtivo predominante nas duas visitas foi o de animais em época de cobrição (*pós-desmame/gestante*), sendo seguido de perto pelas ovelhas em *pós-parto* (Tabela 5.11). O número de ovelhas alfeiras foi bastante inferior ao das classes anteriormente referidas.

Tabela 5.11 – Estado produtivo das ovelhas, em cada visita

Estado produtivo	1ª Visita		2ª Visita	
	Nº	%	Nº	%
<b>Pós-parto</b>	721	39,8	674	44,5
<b>Alfeira</b>	38	2,1	45	2,9
<b>Cobrição</b>	1054	58,1	797	52,6
<b>Total</b>	1813	100	1516	100

Analisando as raças dos animais, e tendo em conta que só considerámos um animal como pertencente a determinada raça se estivesse inscrito no livro genealógico da mesma, avaliámos exclusivamente as duas raças de ovinos que apresentam uma maior expressão no Alentejo (Carolino *et al.*, 2019). Assim o número de ovinos pertencentes à raça merina branca (n=419) foi sensivelmente o dobro da merina preta (n=190). Os restantes animais foram classificados como tipo merino (n=703) e de raça cruzada (n=598), tal como está expresso na Tabela 5.12.

Tabela 5.12 – Raças a que pertencem os animais observados

Raça	Quantidade	%
<b>Merina branca</b>	419	21,9
<b>Merina preta</b>	190	10
<b>Tipo merino</b>	703	36,8
<b>Cruzada</b>	598	31,3
<b>Total</b>	1910	100

Relativamente à idade, foi possível encontrar registos da data de nascimento válidos em 1865 animais. Para os restantes 45, ou não foi possível encontrar um registo na base de dados do IFAP que correspondesse à identificação auricular possuída pelos animais, ou então a data de nascimento registada não correspondia à realidade, tendo-se confirmado essa incompatibilidade através da dentição exibida pelo ovino. Assim, a idade média dos animais rondou os quatro anos e meio, sendo que na 1ª avaliação a  $\mu=54,9$  meses ( $\sigma=37,3$ ) enquanto na 2ª o valor foi, previsivelmente, ligeiramente superior ( $\mu=56,8$ ;  $\sigma=36,9$ ). Para facilitar a análise desta variável estabelecemos então quatro classes etárias (Tabela 5.13), sendo que em ambas as visitas a classe com maior frequência foi aquela que contempla animais entre os dois e os quatro anos de idade, sendo seguida pelos ovinos com idade compreendida entre quatro e oito anos.

Tabela 5.13 – Classes de idades dos animais observados, em cada visita

Classe etária (anos)	1ª Visita		2ª Visita	
	Nº	%	Nº	%
≤ 2	312	17,1	231	15,3
> 2 e ≤ 4	635	34,8	550	36,5
> 4 e ≤ 8	599	32,8	484	32,1
> 8	278	15,2	243	16,1
<b>Total</b>	<b>1824</b>	<b>100</b>	<b>1508</b>	<b>100</b>

A análise global dos resultados obtidos nas análises hematológicas hematócrito e quantificação das proteínas totais não revelou diferenças expressivas entre as amostras de sangue colhidas na 1ªs e 2ªs deslocações às herdades (Tabela 5.14). No caso da avaliação da condição corporal a questão é diferente, já que houve um claro aumento deste fator entre as visitas às explorações (Tabela 5.14). De facto, o valor médio verificado na primeira visita ( $\mu_1=2,33$ ) poderá mesmo ser preocupante, uma vez que valores de pontuação da condição corporal inferiores a 2,5 refletem um mau estado sanitário do animal, sendo considerados valores inadequados para qualquer ovino adulto (Wassink *et al.*, 2010a). Seguindo esse critério, entre as 3373 avaliações da condição corporal, registamos que 1176 (34,9%) apresentaram uma condição corporal inferior ou igual a 2, tendo mesmo havido 148 registos de condição corporal 1, que corresponde ao valor mínimo da escala. Evidentemente que os valores desta magnitude poderão revelar que esses ovinos se encontram sujeitos a uma situação de carência alimentar, encontrando-se assim mais vulneráveis ao desenvolvimento de diversos estados patológicos.

Tabela 5.14 – Estatísticas descritivas para a condição corporal, hematócrito e proteínas totais

Resultado	Unidade	Visita	n	Média	Mediana	Q1 – Q3	Mín – Máx	$\sigma$
Condição corporal	Pontos	1ª	1851	2,33	2,5	2 – 3	1 – 5	0,71
		2ª	1522	2,82	3	2,5 – 3,5	1 – 5	0,79
Hematócrito	%	1ª	1675	31,25	32	28 – 35	11 – 55	5,92
		2ª	1376	32,82	33	30 – 36	12 – 61	4,86
Proteínas totais	g / dL	1ª	1676	6,59	6,5	6 – 7,2	4,2 – 9,8	0,84
		2ª	1377	6,42	6,4	6 – 6,8	2,9 – 8,8	0,59

Relativamente aos fatores climáticos, foram calculados os valores da *precipitação acumulada* e *temperatura média* com base nos dados recolhidos nas seis semanas anteriores a cada sessão de classificação de lesões de peira. Os valores obtidos para as duas variáveis nas visitas às 17 explorações são apresentados na Tabela 5.15.

Tabela 5.15 – Valores de precipitação e temperatura média verificados nas seis semanas que antecederam as visitas às explorações

Exp.	1ª Visita			2ª Visita		
	Data	Prec (mm/m <sup>2</sup> )	T méd (°C)	Data	Prec (mm/m <sup>2</sup> )	T méd (°C)
A/B	06/12/2016	136,6	13,3	09/03/2017	114,2	11,6
C	20/12/2016	155,5	12,4	26/01/2017	108,2	9,4
D	27/12/2016	127,7	9,8	05/05/2017	31	15,5
E	04/01/2017	100,8	10,3	23/03/2017	78	12,2
F	09/01/2017	105,8	10,1	19/04/2017	47,8	14,8
G	11/01/2017	84,5	10,3	07/03/2017	139,9	10,8
H	16/01/2017	61,4	10,9	14/03/2017	123,2	12,3
I	18/01/2017	75,2	9,8	04/04/2017	76,1	12,8
J	24/01/2017	71,5	8,7	30/03/2017	67,8	12,4
K	15/01/2018	119,4	10,7	03/04/2018	196,9	12,5
L	23/01/2018	81,1	10,3	19/04/2018	181,9	12,2
M	08/02/2018	102,8	10,6	08/05/2018	118,3	14,5
N	20/02/2018	38,4	8,8	23/04/2018	240,8	12
O	27/02/2018	12,4	9,3	03/05/2018	124	13,1
P	13/03/2018	175	10,8	11/06/2018	35,9	17,6
Q	27/03/2018	254,9	11,1	16/05/2018	121,7	14,6

Legenda: Exp. – Exploração; Prec – Precipitação; T méd – Temperatura média

### 5.3.2 – Amostra com todas as observações

Entre a totalidade das observações realizadas nos 1910 ovinos testados nas duas visitas, em 14,91% delas foram identificadas lesões de peeira em pelo menos um membro (IC95% [13,64; 16,27]). Essa percentagem reduz-se para 5,81% se forem consideradas apenas as lesões graves de peeira (IC95% [5,02; 6,68]). Contudo, podemos constatar pela observação das Tabelas 5.16 e 5.17 que estes valores não se distribuem de forma uniforme nos dois anos de estudo em que ocorreram as visitas a cada exploração. Conseguimos assim observar que os valores extremos (mínimo e máximo), tanto para as lesões de peeira como para as lesões graves, situaram-se todos no segundo ano do estudo. Nesse ano, a percentagem de lesões de peeira evoluiu, entre as duas visitas, de 6,2 para 23,7%, enquanto no caso das lesões consideradas graves a expressão daquela tendência positiva também ocorreu, mas de forma menos marcada, tendo evoluído de 2,1 para 8,7%. Registou-se assim um agravamento dos graus lesionais entre as primeira e segunda visitas.

Tabela 5.16 – Comparação entre as classificações lesionais obtidas nas 1ª e 2ª visitas, no primeiro ano de estudo

	1ª Visita			2ª Visita		
	Nº	%	IC 95%	Nº	%	IC 95%
Sem lesões	712	62,1	[57,6; 66,8]	543	65,4	[60; 71,1]
Grau ≥ 1	435	37,9	[34,4; 41,7]	287	34,6	[30,7; 38,8]
Grau ≥ 2	158	13,8	[11,7; 16,1]	136	16,4	[13,8; 19,4]
Grau ≥ 3	52	4,5	[3,4; 5,9]	68	8,2	[6,4; 10,4]
Amostra	n = 1147			n = 830		

Tabela 5.17 – Comparação entre as classificações lesionais obtidas nas 1ª e 2ª visitas, no segundo ano de estudo

	1ª Visita			2ª Visita		
	Nº	%	IC 95%	Nº	%	IC 95%
Sem lesões	634	89,7	[82,8; 96,9]	416	58,7	[53,2; 64,6]
Grau ≥ 1	73	10,3	[8,1; 13]	293	41,3	[36,7; 46,3]
Grau ≥ 2	44	6,2	[4,5; 8,4]	168	23,7	[20,3; 27,6]
Grau ≥ 3	15	2,1	[1,2; 3,5]	62	8,7	[6,7; 11,2]
Amostra	n = 707			n = 709		

### 5.3.2.1 – Distribuição das lesões

Se tivermos como critério a análise dos quatro membros de cada animal como unidades independentes, e avaliando a totalidade dos 13572 membros classificados, constatamos que foram categorizados 820 membros com lesões de peeira (6,04% do total, IC 95% [5,64; 6,47]). Destes, a maior proporção corresponde a um dos membros posteriores (58,2%), o que revela uma diferença estatisticamente significativa quando comparada com os membros anteriores ( $\chi^2=44,083$ ; valor  $p < 0,001$ ). Já no que respeita à divisão através de um plano sagital, verificamos que a diferença entre o hemisfério esquerdo (50,2%) e direito (49,8%) é estatisticamente inexistente ( $\chi^2=0,024$ ; valor  $p > 0,05$ ) (Tabela 5.18).

Tabela 5.18 – Distribuição das lesões de peeira pelos membros

Membros	Direito	Esquerdo	Total
Anterior	MAD 160	MAE 183	343 (41,8%)
Posterior	MPD 248	MPE 229	477 (58,2%)
Total	408 (49,8%)	412 (50,2%)	820 (100%)

Para a grande maioria dos animais avaliados no estudo não foram registadas lesões de peeira em quaisquer dos membros (84,9%) (Tabela 5.19). Se considerarmos os membros que apresentaram lesões severas de peeira, a proporção correspondente aos animais que não evidenciou essa categoria de lesões em qualquer membro é, de forma lógica, ainda mais elevada (94,2%) (Tabela 5.19).

Tabela 5.19 – Distribuição do número de membros que apresentaram lesões de peeira ( $\geq 2$ ) e lesões severas ( $\geq 3$ )

Número de Membros	Lesões de peeira		Lesões severas de peeira	
	Nº	%	Nº	%
0	2880	84,9	3195	94,2
1	314	9,3	144	4,2
2	120	3,5	40	1,2
3	50	1,5	7	0,2
4	29	0,8	7	0,2
Total	3393	100	3393	100

Considerando apenas os animais em que foram observadas lesões de peeira, no Gráfico 5.1 apresentamos a repartição percentual dos registos que tiveram um, dois, três ou quatro membros afetados, segundo as definições de *lesões de peeira* e *lesões severas de peeira*. A interpretação dos gráficos torna evidente, conforme expectável, que para ambas as análises é notória a tendência para uma proporção decrescente de animais terem um maior número de membros afetados simultaneamente.

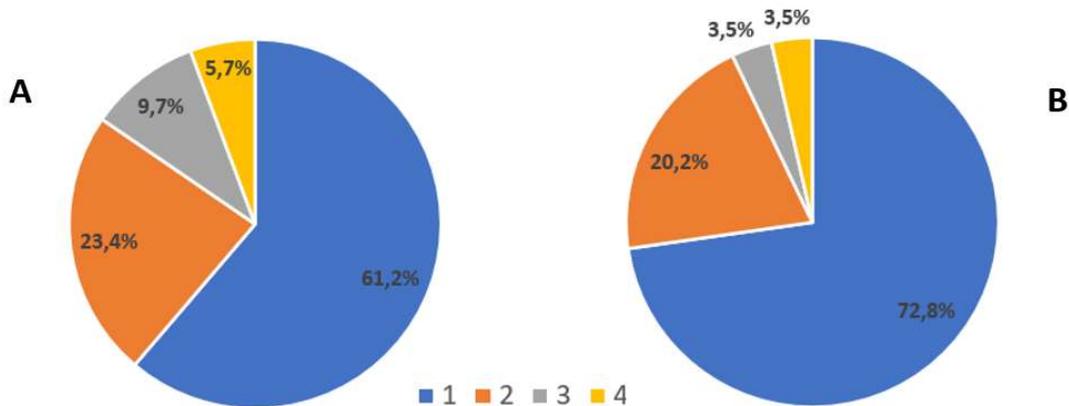


Gráfico 5.1 – Distribuição dos membros afetados com lesões de peeira (A, n=513) e lesões severas (B, n=198)

O Gráfico 5.2 representa as distribuições dos *scores acumulados* (0–16) de todos os ovinos que, em relação a cada avaliação, apresentavam três ou quatro membros com lesões de peeira. Apenas considerámos nesta análise os animais com um maior número de membros afetados, uma vez que para os restantes animais esta análise torna-se pouco precisa, pelos motivos que apresentaremos adiante. Para os animais com três membros lesionados (n=50), os somatórios mais frequentes foram 8 e 7, enquanto para os que tinham todos os membros com sinais de peeira (n=29) o total mais frequente foi 10. O *score* acumulado máximo foi de 14, tendo sido exibido apenas por dois animais.

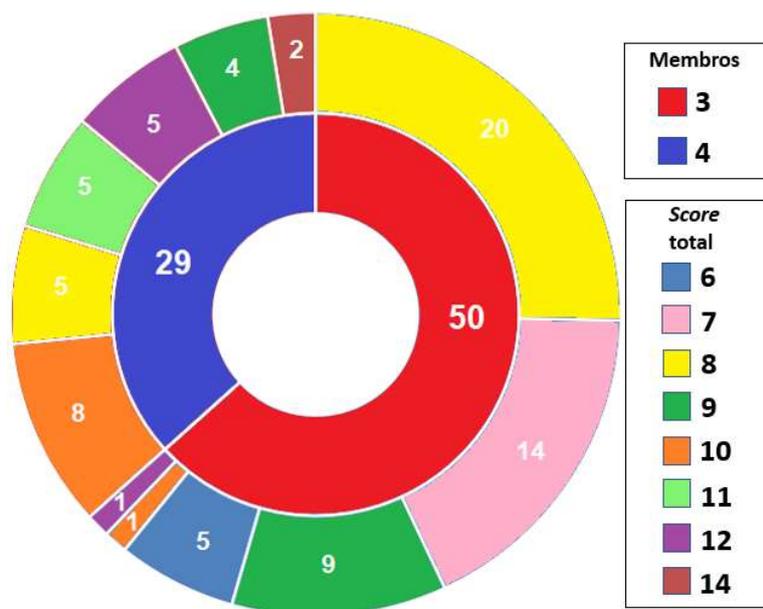


Gráfico 5.2 – Scores totais dos ovinos que têm lesões de peeira em três ou quatro membros (n=79)

### 5.3.2.2 – Análise dos fatores individuais relacionados com a peeira

No que respeita à distribuição etária, se compararmos apenas os registos referentes aos animais que têm idade inferior ou igual a quatro anos com aqueles que pertencem a um escalão etário superior, constatamos que a probabilidade de um animal do primeiro grupo apresentar lesões de peeira é praticamente o dobro da registada pelos animais de idade superior a quatro anos (OR=1,9305; valor  $p < 0,001$ ; IC95% [1,59; 2,35]). Analisando a distribuição segundo as quatro faixas etárias definidas, verifica-se que ao longo das primeiras três há uma frequência crescente de animais afetados (Tabela 5.20). No caso da categoria etária mais elevada (superior a oito anos), apesar de não ocorrer um aumento da prevalência de infeção relativamente à classe anterior, verificamos que os valores relativos são idênticos entre si, não exibindo uma diferença estatisticamente significativa (valor  $p > 0,05$ ).

Relativamente ao sexo dos animais, verificou-se que os machos apresentaram uma possibilidade de exibirem lesões de peeira cerca de 3,7 vezes superior às das fêmeas (Tabela 5.20), sem descurar o facto já referido de o padrão amostral dos dois grupos ter sido consideravelmente desigual. No caso do estado produtivo das ovelhas, não se identificou qualquer diferença estatisticamente significativa entre as fêmeas que se encontravam em pós-parto e aquelas que estavam no grupo de cobrição (valor  $p > 0,05$ ). O conjunto das alfeiras foi aquele que exibiu uma frequência de infeção superior, contudo a dimensão da amostra representada neste grupo foi bastante mais escassa do que as proporções registadas pelos outros grupos (Tabela 5.20).

Tendo em consideração as raças incluídas na análise, verificou-se que os ovinos de raça merina preta foram aqueles que apresentaram uma percentagem de infeção mais reduzida (2,3%), o que se traduz numa probabilidade seis vezes mais reduzida destes animais exibirem lesões de peeira do que a evidenciada pela raça merina branca (12,6%). Os dois outros grupos analisados foram os ovinos do tipo merino (22,6%) e os animais de raça cruzada (12,9%), tendo ambos também apresentado uma prevalência consideravelmente superior à obtida para a raça merina preta, tal como podemos constatar após observação da Tabela 5.20.

No que se refere à condição corporal dos animais, não foi possível identificar uma diferença estatisticamente significativa entre os que revelaram uma condição corporal mais reduzida ( $\leq 2,5$ ) e os que exibem condições corporais superiores (valor  $p > 0,05$ ) (Tabela 5.20).

Tabela 5.20 – Análise univariada dos fatores individuais e a sua relação com a ocorrência de lesões de peeira

Variável (n)	Animais com peeira		OR	IC 95 %	Valor p
	Nº	%			
<b>Idade</b> (3329)					
≤ 2 (542)	27	5,0			
> 2 e ≤ 4 (1184)	163	13,8	3,0451	[2; 4,64]	< 0,001
> 4 e ≤ 8 (1082)	214	19,8	4,7026	[3,11; 7,12]	< 0,001
> 8 (521)	95	18,2	4,2536	[2,72; 6,65]	< 0,001
<b>Sexo</b> (3393)					
Fêmea (3329)	488	14,7			
Macho (64)	25	39,1	3,7319	[2,24; 6,22]	< 0,001
<b>Estado produtivo</b> (3329)					
Cobrição (1851)	258	13,9			
Pós-parto (1395)	206	14,8	1,0697	[0,88; 1,3]	0,5044
Alfeira (83)	24	28,9	2,5116	[1,54; 4,11]	< 0,001
<b>Raça</b> (3393)					
Merina preta (343)	8	2,3			
Merina Branca (725)	91	12,6	5,9925	[2,87; 12,5]	< 0,001
Tipo Merino (1175)	265	22,6	12,158	[5,95; 24,84]	< 0,001
Cruzada (1150)	148	12,9	6,1667	[3; 12,7]	< 0,001
<b>Condição corporal</b> (3371)					
> 2,5 (1351)	194	14,4			
≤ 2,5 (2020)	314	15,6	1,0977	[0,9; 1,33]	0,3461

Avaliando agora a existência de uma correlação estatística entre presença de lesões de peeira e o resultado das análises sanguíneas que foram executadas, constatamos que apenas o hematócrito exibiu uma correlação significativa com as alterações da variável de resposta (Tabela 5.21). O facto de o coeficiente da variável *hematócrito* exibir um coeficiente com sinal negativo indica-nos que, nos animais com lesões de peeira, o valor médio do hematócrito foi mais reduzido do que aquele registado para os animais sem lesões daquela doença.

Tabela 5.21 – Regressão linear entre as análises sanguíneas e a presença de lesões de peeira (n=3049)

Variável dependente: Lesões de peeira	Coeficiente	Erro padrão	Valor p
<b>Hematócrito</b>	- 0,00488187	0,00115096	< 0,001
<b>Proteínas totais</b>	- 0,00505012	0,00855986	0,5552
Constante	0,329948	0,0624622	< 0,001
R <sup>2</sup> = 0,06357		R <sup>2</sup> ajustado = 0,05704	
Critério Akaike = 2203,4		Critério Schwarz = 2221,468	

Para investigar o efeito das variáveis climáticas na expressão clínica da peeira, realizámos uma análise de regressão linear entre a percentagem de animais que, em cada visita, se apresentou afetada pela doença (variável dependente), e os valores climáticos que foram registados em cada exploração nas seis semanas que antecederam a visita (variáveis independentes). Tal como podemos observar na Tabela 5.22, apenas a variável precipitação acumulada apresentou significância estatística. O coeficiente exibido por essa variável tem sinal positivo, cuja interpretação indicia que quanto maior for o nível de precipitação registada, maior será a proporção de ovinos clinicamente afetados por peeira.

Tabela 5.22 – Análise entre os fatores climáticos e a percentagem de animais com peeira, pelo modelo de regressão linear (n=34)

Var. dependente: % de lesões de peeira	Coeficiente	Erro padrão	Valor p
Precipitação	0,0792425	0,0459663	< 0,1
Temperatura média	- 0,491013	1,26059	0,6996
Constante	11,9732	16,0365	0,4609
R <sup>2</sup> = 0,092723		R <sup>2</sup> ajustado = 0,034188	
Critério Akaike = 281,7762		Critério Schwarz = 286,3552	

### 5.3.2.3 – Análise multifatorial dos fatores individuais e de grupo relacionados com a observação de lesões de peeira

As 24 variáveis que integravam o modelo inicial foram sendo progressivamente reduzidas, de acordo com o critério de rejeição dos valores p mais elevados no teste t assintótico. Assim, no final restaram 13 variáveis, estando as mesmas exibidas na Tabela 5.23. Todas apresentaram uma significância inferior a 0,01, residindo a única exceção no fator raça merina branca. O facto de esta variável estar associada a um valor p elevado significa que não se detetaram diferenças estatisticamente significativas entre ela e a variável de referência (raça cruzada). Relativamente às restantes 12 variáveis, metade apresentou uma relação positiva com a variável dependente (*idade, macho, tipo merino, área destinada aos animais, estabulação e precipitação*), enquanto as restantes seis evidenciaram uma correlação inversa com a presença de lesões de peeira nos animais (*merina preta, efetivo, regadio, má drenagem, separação dos animais afetados, e vacina*).

Tabela 5.23 – Modelo multifatorial para presença/ausência de lesões de peira nos ovinos (logit)

Var. dependente: Peira nos animais (n=3330)	Coefficiente	Erro padrão	Declive	Valor p
Idade	0,00744304	0,00132957	0,000729121	< 0,001
Macho	1,42672	0,283994	0,226577	< 0,001
Merina Preta	-1,54079	0,408179	-0,0963437	< 0,001
Merina Branca	0,140395	0,196149	0,014189	0,4741
Tipo Merino	1,26182	0,175377	0,146424	< 0,001
Área para os animais	0,00254486	0,000440129	0,000249295	< 0,001
Efetivo	-0,000593699	0,000223764	-5,81588 x 10 <sup>-5</sup>	< 0,001
Estabulação	0,614162	0,171239	0,0607224	< 0,001
Pastoreio em regadio	-0,915767	0,1866	-0,0777701	< 0,001
Má drenagem	-0,769267	0,199434	-0,0624857	< 0,001
Separação afetados	-1,00228	0,153139	-0,116882	< 0,001
Vacina	-0,613554	0,228933	-0,0532714	< 0,001
Precipitação acumulada	0,0104083	0,00123492	0,0010196	< 0,001
Constante	-3,71693	0,232428		< 0,001
R <sup>2</sup> McFaden = 0,116301		R <sup>2</sup> ajustado = 0,106361		
Critério Akaike = 2517,359		Critério Schwarz = 2602,909		

A matriz de frequências cruzadas referente a este modelo (Tabela 5.24) demonstra que o número de observações corretamente preditas é elevado (85,1%). Contudo, o modelo apresenta capacidades totalmente distintas para diagnosticar casos de ausência ou de presença de lesões, tal como é demonstrado, respetivamente, pelos valores contrastantes dos respetivos graus de especificidade (99,7%) e de sensibilidade (2,6%). Os indicadores epidemiológicos deste modelo estão apresentados na Tabela 5.25.

Tabela 5.24 – Matriz de frequências cruzadas do modelo multifatorial (n=3330)

		Predito	
		Não	Sim
Real	Não	2820	10
	Sim	487	13

Tabela 5.25 – Parâmetros epidemiológicos do modelo multifatorial (n=3330)

Parâmetros	Valores
Nº Variáveis	13
Precisão (%)	85,1
IC95% Precisão	[83,8; 86,3]
Sensibilidade (%)	2,6
Especificidade (%)	99,7
VPP (%)	56,5
VPN (%)	85,3

### 5.3.2.4 – Análise comparativa entre explorações

Tendo em conta uma análise mais detalhada ao nível de cada unidade pecuária, verificamos que os padrões de distribuição pelos diferentes *scores máximos* apresentados por cada exploração foram bastante distintos, sendo de referir ainda que ao nível de cada exploração também se verificaram diferenças assinaláveis entre as duas visitas (Tabelas 5.26 e 5.27). Pode-se confirmar que o grau lesional mais recorrente foi o grau 0, sendo que em apenas três visitas, das 34 realizadas, não foi esta a classificação mais frequente. Considerando a totalidade das visitas, em metade delas foram observadas lesões pertencentes aos cinco níveis da escala utilizada (0-4). Na outra metade não se observaram quaisquer animais que pudessem ser integrados no(s) patamar(es) mais elevado(s).

Tabela 5.26 – Distribuição dos ovinos por grau lesional nas explorações avaliadas no primeiro ano da análise

Exp.	Grau	1ª Visita		2ª Visita		Exp.	Grau	1ª Visita		2ª Visita	
		Nº	%	Nº	%			Nº	%	Nº	%
A	0	81	84,4	84	98,8	B	0	40	38,5	50	48,1
	1	13	13,5	1	1,2		1	45	43,3	45	43,3
	2	2	2,1	0	0		2	16	15,4	9	8,7
	3	0	0	0	0		3	2	1,9	0	0
	4	0	0	0	0		4	1	1	0	0
C	0	92	54,1	20	21,3	D	0	106	75,7	48	98
	1	38	22,4	21	22,3		1	30	21,4	1	2
	2	24	14,1	22	23,4		2	4	2,9	0	0
	3	14	8,2	28	29,8		3	0	0	0	0
	4	2	1,2	3	3,2		4	0	0	0	0
E	0	39	35,1	68	65,4	F	0	91	79,1	107	99,1
	1	45	40,5	12	11,5		1	23	20,0	1	0,9
	2	19	17,1	12	11,5		2	1	0,9	0	0
	3	8	7,2	11	10,6		3	0	0	0	0
	4	0	0	1	1		4	0	0	0	0
G	0	80	83,3	19	37,3	H	0	69	63,3	52	53,6
	1	16	16,7	19	37,3		1	18	16,5	26	26,8
	2	0	0	8	15,7		2	10	9,2	8	8,2
	3	0	0	5	9,8		3	10	9,2	10	10,3
	4	0	0	0	0		4	2	1,8	1	1,1
I	0	66	65,3	62	78,5	J	0	47	45,2	33	55,9
	1	27	26,7	10	12,7		1	22	21,2	9	15,3
	2	5	5,0	4	5,1		2	25	24,0	10	16,9
	3	2	2,0	3	3,8		3	5	4,8	4	6,8
	4	1	1,0	0	0		4	5	4,8	3	5,1

Legenda: Exp. – Exploração

Tabela 5.27 – Distribuição dos ovinos por grau lesional nas explorações avaliadas no segundo ano da análise

Exp.	Grau	1ª Visita		2ª Visita		Exp.	Grau	1ª Visita		2ª Visita	
		Nº	%	Nº	%			Nº	%	Nº	%
K	0	105	99,1	101	95,3	L	0	78	78,0	49	50,5
	1	0	0	1	0,9		1	15	15,0	16	16,5
	2	0	0	2	1,9		2	2	2,0	17	17,5
	3	1	0,9	1	0,9		3	4	4,0	11	11,3
	4	0	0	1	0,9		4	1	1,0	4	4,2
M	0	108	98,2	48	43,6	N	0	99	93,4	22	19
	1	2	1,8	20	18,2		1	2	1,9	51	44
	2	0	0	28	25,5		2	2	1,9	35	30,2
	3	0	0	12	10,9		3	3	2,8	4	3,4
	4	0	0	2	1,8		4	0	0	4	3,4
O	0	70	95,9	33	41,3	P	0	95	88,8	94	98
	1	0	0	16	20,0		1	4	3,7	1	1
	2	3	4,1	19	23,8		2	6	5,6	1	1
	3	0	0	11	13,8		3	1	0,9	0	0
	4	0	0	1	1,3		4	1	0,9	0	0
Q	0	79	75,2	69	66,3						
	1	6	5,7	20	19,2						
	2	16	15,2	4	3,8						
	3	4	3,8	7	6,7						
	4	0	0	4	3,8						

Legenda: Exp. – Exploração

Para mais facilmente visualizar e poder reconhecer as variações verificadas entre as duas visitas, construímos os Gráficos 5.3 e 5.4, onde podemos observar as distribuições percentuais correspondentes a cada score, referentes aos dois anos da análise.

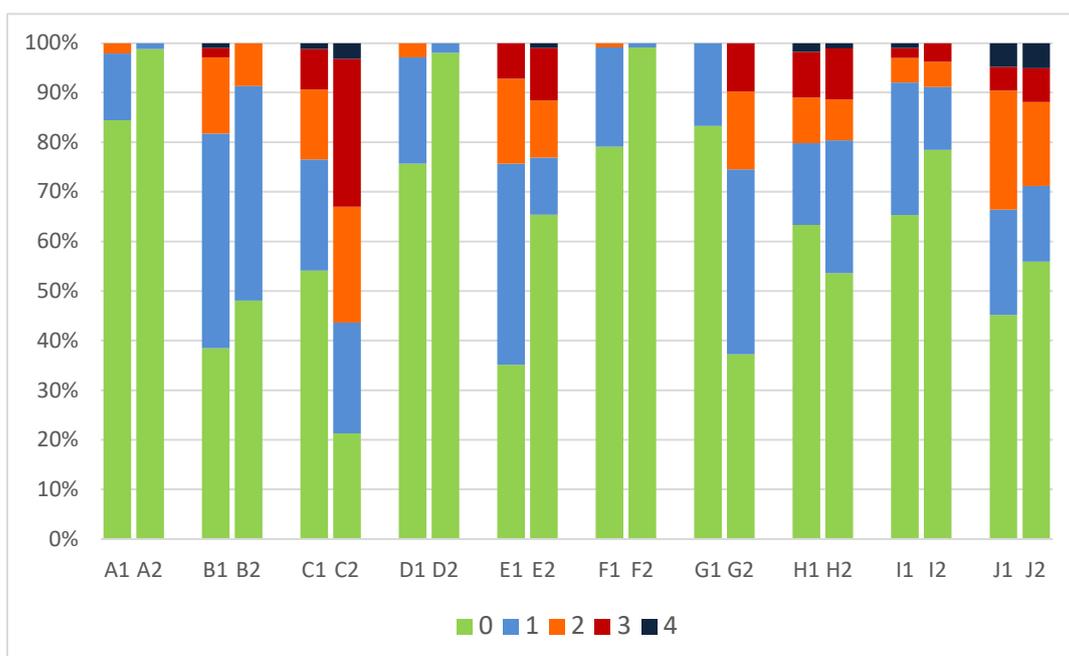


Gráfico 5.3 – Distribuição percentual dos scores máximos observados em cada uma das visitas realizadas, no 1º ano do estudo

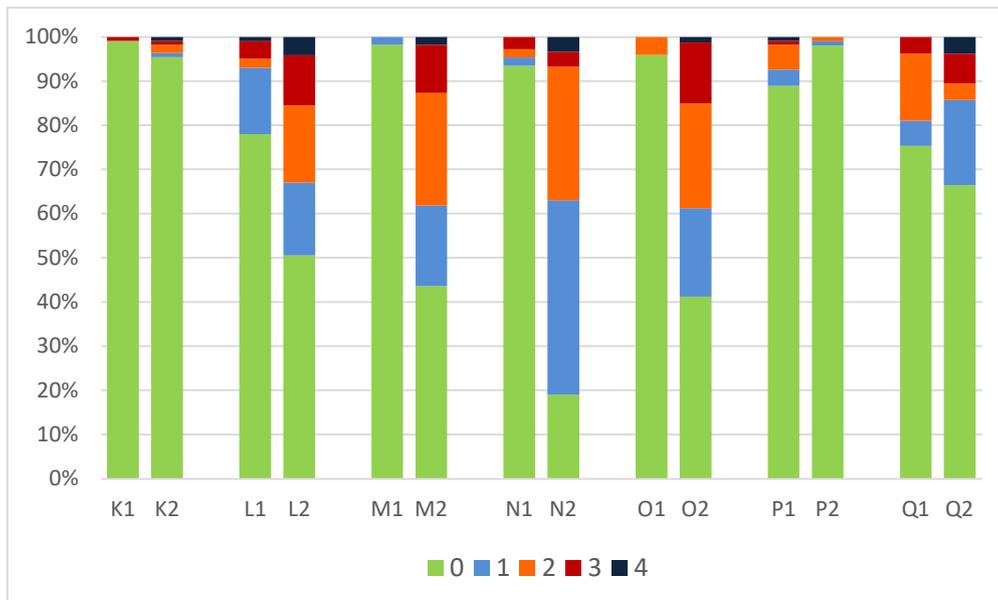


Gráfico 5.4 – Distribuição percentual dos scores máximos observados em cada uma das visitas realizadas, no 2º ano do estudo

Pela observação do Gráfico 5.5 podemos constatar que nas visitas do primeiro ano (2017), se verificou que algumas explorações registaram valores idênticos de animais com peira entre as duas visitas (com variação inferior a 5%), como foi o caso das herdades E, H, I e J. Por seu turno, as explorações C e G apresentaram aumentos substanciais nas frações de animais com lesões de peira, enquanto a exploração B registou uma tendência inversa. Há ainda a destacar as unidades A, D e F, que apresentaram valores marginais de animais com lesões de peira, não tendo sido observada nenhuma lesão considerada grave.

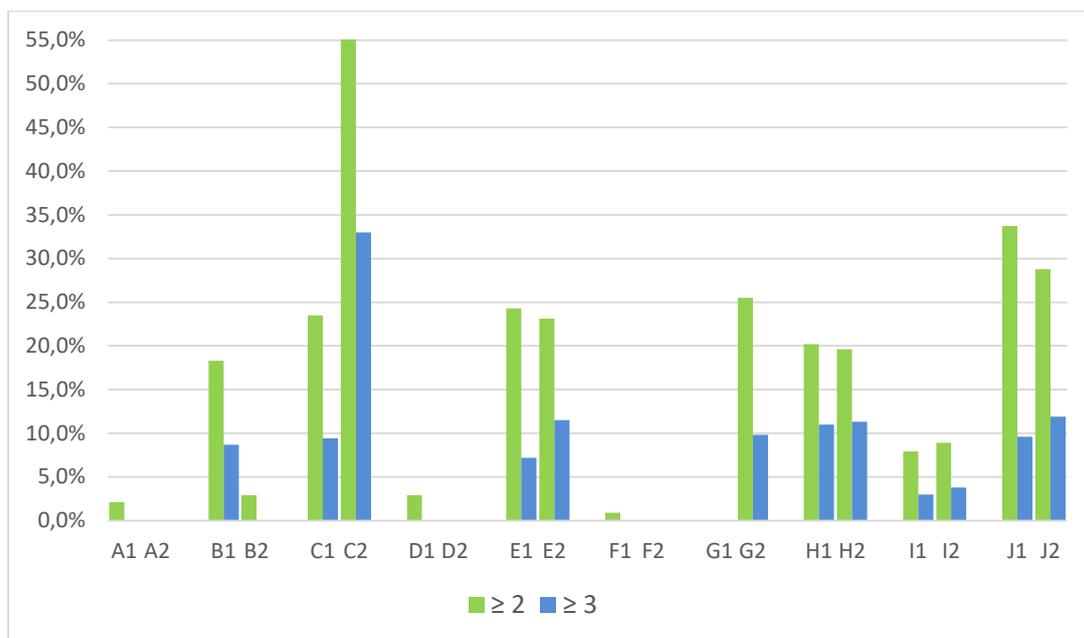


Gráfico 5.5 – Percentagem de ovinos que apresentaram lesões de peira (verde) e lesões graves de peira (azul) em cada uma das visitas que decorreram durante o primeiro ano

O Gráfico 5.6 reflete os dados referentes às visitas realizadas no ano de 2018, sendo de destacar que quatro explorações (L, M, N e O) evidenciaram aumentos muito substanciais na quantidade de animais afetados entre a primeira e segunda visitas. Esta indicação verificou-se não só para a variável *lesões de peeira*, mas também para as *lesões severas de peeira*. Na exploração P conseguimos observar uma tendência de redução entre as duas visitas, enquanto nas unidades K e Q a variação foi praticamente insignificante. Ainda assim, nesta última verificou-se um agravamento do número de animais que exibiam lesões severas de peeira.

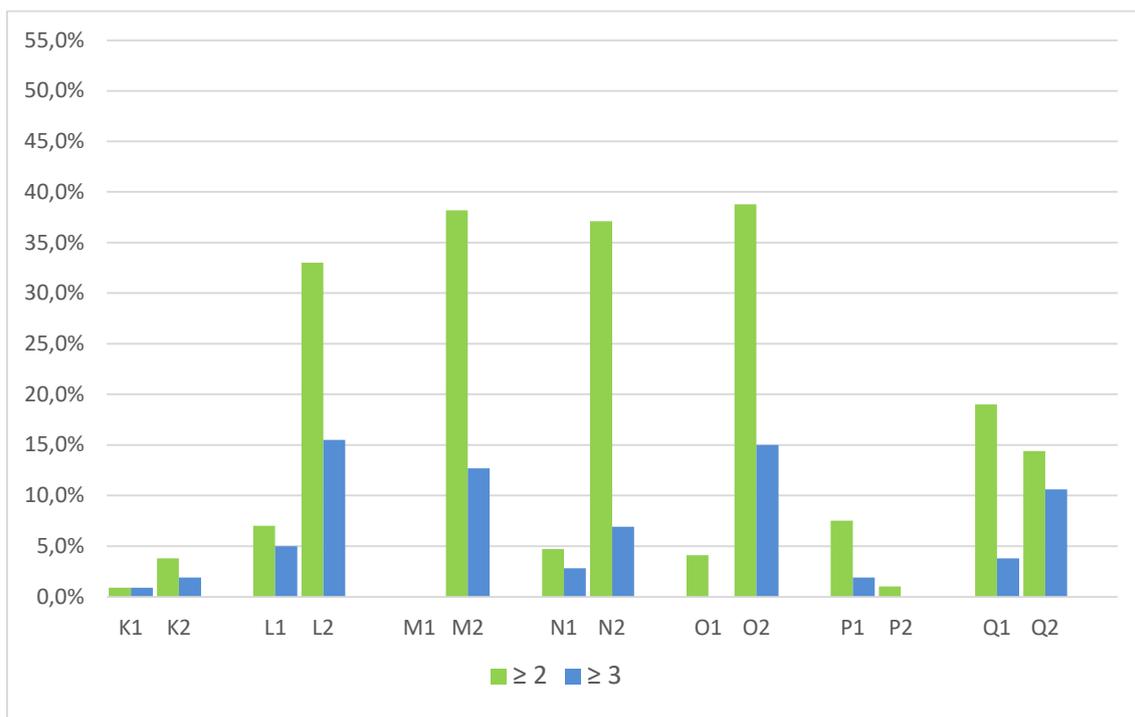


Gráfico 5.6 – Percentagem de ovinos que apresentaram lesões de peeira (verde) e lesões graves de peeira (azul) em cada uma das visitas que decorreram durante o segundo ano

### 5.3.3 – Amostra relativa aos animais que tiveram duas observações

Por forma a reconhecer alguns aspetos concretos sobre a dinâmica da doença, considerámos apenas o conjunto de animais que foram avaliados em dois momentos distintos (n=1483), tendo sido possível constatar que 380 deles exibiram lesões de peeira em pelo menos uma das visitas, traduzindo-se numa percentagem global de infeção por peeira de 25,62% (IC95% [23,11; 28,33]). Por outro lado, a proporção de ovinos que exibiu lesões nas duas avaliações foi consideravelmente mais reduzida, cifrando-se em 5,13% (IC95% [4,04; 6,41]). A análise simultânea das duas visitas no que respeita à presença ou ausência de lesões de peeira encontra-se expressa na Tabela 5.28.

Tabela 5.28 – Análise da presença/ausência de lesões de peira nas duas visitas

		1ª Visita		Total
		Ausência	Presença	
2ª Visita	Ausência	1103 (74,4%)	81 (5,5%)	1184 (79,9%)
	Presença	223 (15%)	76 (5,1%)	299 (20,1%)
Total		1326 (89,4%)	157 (10,6%)	<b>1483 (100%)</b>

A prevalência obtida no segundo ano (26,5% com IC 95% [22,74; 30,63]) foi apenas ligeiramente superior à obtida no ano anterior (24,9% com IC 95% [21,57; 28,61]), sendo que tal diferença não revelou qualquer significância estatística (valor  $p > 0,05$ ).

### 5.3.3.1 – Distribuição das lesões pelos membros

Focando a análise comparada dos *scores* atribuídos a cada membro nas duas observações a que foram submetidos, apuramos que a atribuição do grau 0 nas duas visitas foi a combinação mais frequentemente registada para os quatro membros, destacando-se por larga margem das restantes 24 combinações (Tabela 5.29). Os valores percentuais mínimo e máximo dessa conjugação de resultados foram, respetivamente, 69,7% (IC 95% [65,47; 74,04]) para o MPD e 78,1% (IC 95% [73,65; 82,72]) para o MAE.

Tabela 5.29 – Combinação dos graus lesionais registados nas duas visitas, para cada membro

MAD																					
1ª Visita	1304					129				39				11							
2ª Visita	1136	97	47	23	1	99	22	3	5	24	7	3	4	1	5	1	2	3			
MAE																					
1ª Visita	1318					109				38				17			1				
2ª Visita	1158	87	41	30	2	77	20	8	3	1	20	4	10	4	12	1	2	2	1		
MPD																					
1ª Visita	1300					116				48				15			4				
2ª Visita	1033	152	79	31	5	81	19	10	6	25	10	5	6	2	4	5	5	1	2	1	1
MPE																					
1ª Visita	1306					112				47				15			3				
2ª Visita	1049	158	71	21	7	74	30	4	2	2	25	3	11	8	5	2	5	1	2	2	1
Graus																					
	0	1	2	3	4																

Investigando a variação, em termos absolutos, do *score* determinado na segunda avaliação, partindo do resultado da observação registada na primeira observação (mínimo -4 e máximo +4), constatamos que, como esperado, o diferencial mais frequente foi o valor nulo, uma vez que, tal como vimos na Tabela 5.29, o grau 0 foi o mais frequente em qualquer das visitas. Assim, por forma a facilitar a visualização da análise comparada das diferentes classes, construímos um diagrama que expressa as diferenças entre as duas visitas, para os quatro membros, tendo sido excluída a combinação de *scores* 0 em ambas as visitas (Gráfico 5.7).

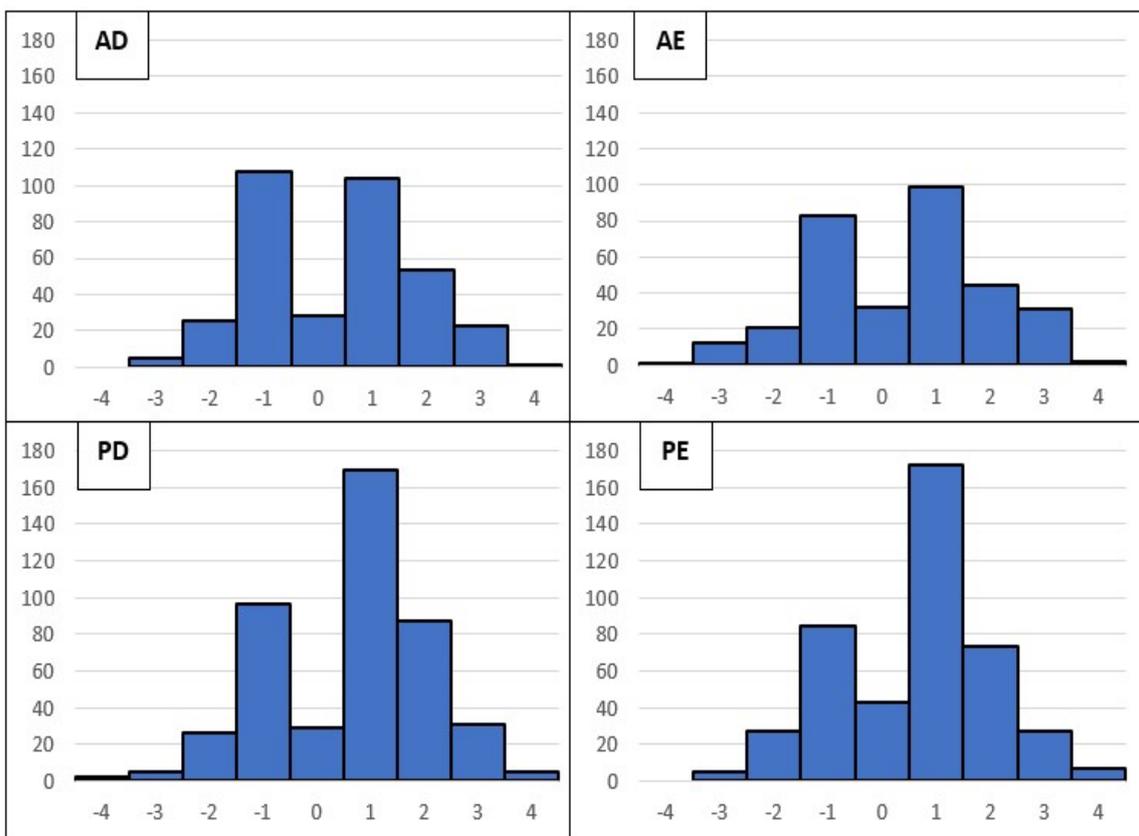


Gráfico 5.7 – Evolução dos scores entre as duas visitas, em cada membro (valores absolutos)

Da análise deste gráfico podemos verificar que os diagramas relativos aos dois membros anteriores dos animais registam valores muito semelhantes entre si, situação que também se repete para os membros posteriores. Apesar de podermos notar que o agravamento das lesões (sentido positivo) assume um peso superior ao evidenciado pela evolução oposta (sentido negativo), podemos observar que no caso dos membros posteriores essa diferença fica bem mais patente, indiciando que nestes membros os *scores* sofreram um maior agravamento entre as visitas. De forma algo curiosa, constatamos que para os quatro membros a classe correspondente à manutenção do grau de severidade da lesão entre as duas visitas (diferencial 0) teve uma reduzida expressão, sem esquecer, no entanto, que o Gráfico 5.7 não considerou aqueles

membros que foram classificados com grau 0 nas duas observações. Esta situação leva-nos a crer que as lesões de peira apresentam uma fraca probabilidade de se manterem inalteradas ao longo do tempo, indiciando que a evolução das respetivas lesões pode ter um significativo dinamismo, não obstante os padrões evolutivos serem distintos.

### 5.3.3.2 – Análise comparativa entre explorações

Para o universo dos animais submetidos a duas avaliações, e tendo em conta que um animal é considerado como afetado caso exiba pelo menos um *score* igual ou superior a 2 em pelo menos uma observação, constatamos que a percentagem de animais com peira foi bastante distinta entre as explorações (Gráfico 5.8). Num patamar superior, temos a destacar a exploração C, onde cerca de 65% dos animais exibiram lesões de peira em pelo menos uma das avaliações, a que se seguiu a exploração J que teve mais de metade dos animais afetados. No extremo oposto, temos cinco explorações (A, D, F, K e P) em que menos de 10% dos ovinos caracterizados neste trabalho apresentaram lesões características de peira.

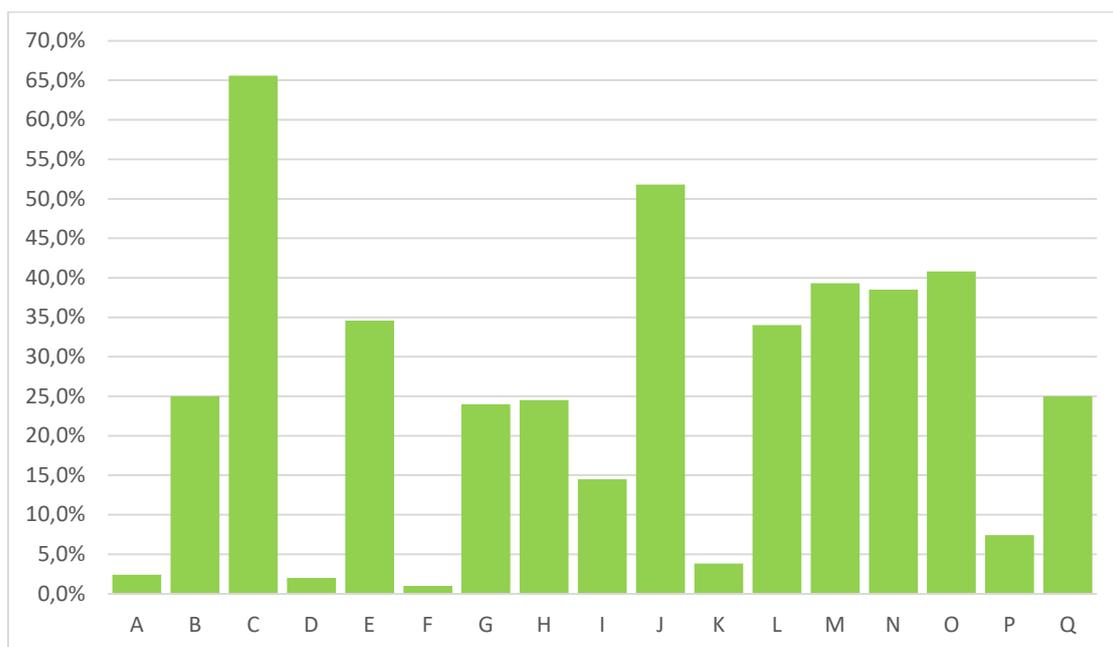


Gráfico 5.8 – Percentagem de ovinos que apresentou lesões de peira em pelo menos uma das visitas (n=1483)

Realizando uma análise idêntica à anterior, mas em que consideramos as lesões com grau superior ou igual a 3, verificamos novamente que as diferenças entre explorações são bem notórias (Gráfico 5.9). O valor máximo desta análise é novamente obtido pela exploração C (37,6%), seguindo-se cinco exploração em que a percentagem de animais que exibiu lesões severas de peira em pelo menos uma ocasião variou entre 15 e 20%, sendo estas a E, H, J, L e O. Na extremidade oposta, temos três explorações (A, D e F) em que nenhum animal apresentou lesões graves de peira e quatro unidades pecuárias (B, I, K e P) em que a prevalência dessas lesões no efetivo testado foi inferior a 5%.

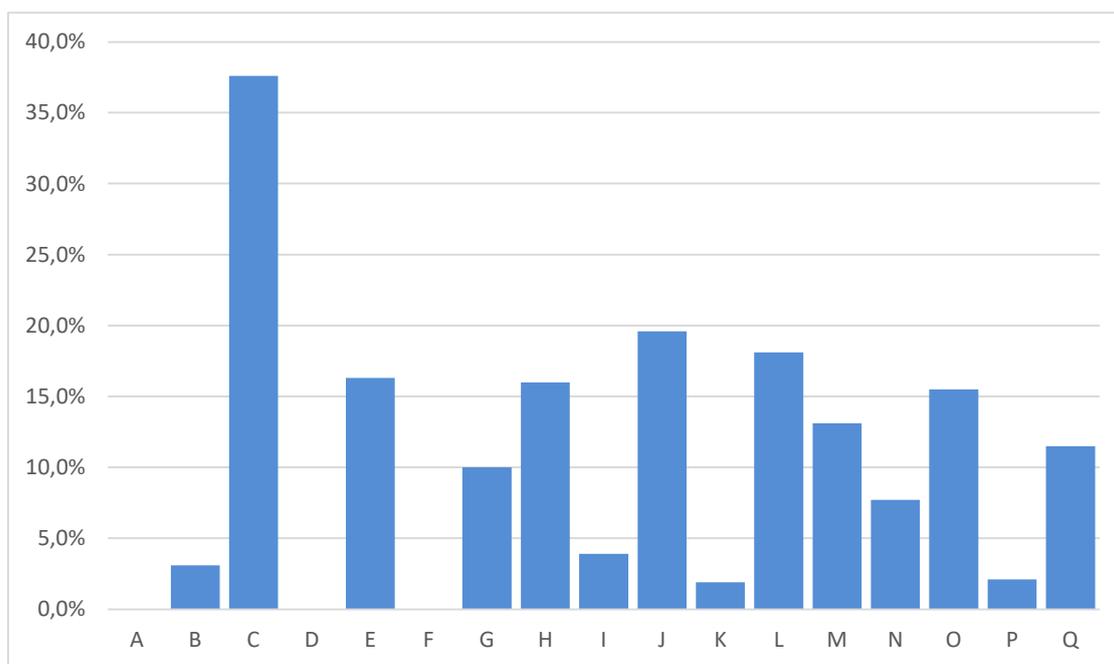


Gráfico 5.9 – Percentagem de ovinos que apresentou lesões severas de peira em pelo menos uma visita (n=1483)

### 5.3.3.3 – Estatuto clínico de peira nas explorações

Relativamente à atribuição de um estatuto clínico de peira para as explorações analisadas, e tendo em conta os valores definidos pelos critérios A e B, verificamos que às explorações A, D e F foi atribuído grau 3, segundo o critério de Frosth *et al.* (2015). Porém, estas unidades não atingiram os valores mínimos, definidos na taxonomia de Raadsma & Egerton (2013), para que pudessem ser incluídas na categoria benigna de peira (Tabela 5.30). As restantes 14 explorações foram incluídas na categoria máxima do critério B. Porém, se tivermos em conta o critério A, metade destas unidades registaram a forma benigna e as remanescentes obtiveram a categoria definida como intermédia (Tabela 5.30). Constatamos, assim, que em conformidade com o critério proposto por Frosth *et al.* (2015) nenhuma destas explorações se encaixou nas categorias 1 ou 2, não correspondendo a situações de peira. Já no que respeita às categorias avançadas por Raadsma & Egerton (2013), nenhum dos efetivos atingiu os valores mínimos para que lhe fosse atribuída a designação *forma virulenta de peira*.

Tabela 5.30 – Análise conjunta dos critérios A e B para a definição do estatuto clínico da peira para as explorações

Critério		Explorações
A	B	
Ausência	3	A / D / F
Benigna	4	B / E / G / H / I / K / P
Intermédia	4	C / J / L / M / N / O / Q

Por forma a sintetizar a preponderância que a doença desempenha em cada uma das explorações, agrupámos as várias unidades pecuárias em classes de acordo com a percentagem de animais que, em alguma das visitas, foi observada com lesões de peeira. Assim, procedemos à distribuição das 17 explorações em cinco categorias (Tabela 5.31), sendo que a localização geográfica de cada uma delas está expressa na Figura 5.10. Podemos constatar que, em função dos resultados obtidos nesta amostra, os diferentes patamares não revelam um padrão definido de distribuição geográfica.

Tabela 5.31 – Ordenação, em classes, das explorações de acordo com a percentagem de animais que exibiu lesões de peeira em alguma das observações

Classes (%)	Explorações
< 5	A / D / F / K
≥ 5 e < 20	I / P
≥ 20 e < 30	B / G / H / Q
≥ 30 e < 40	E / L / M / N
≥ 40	C / J / O

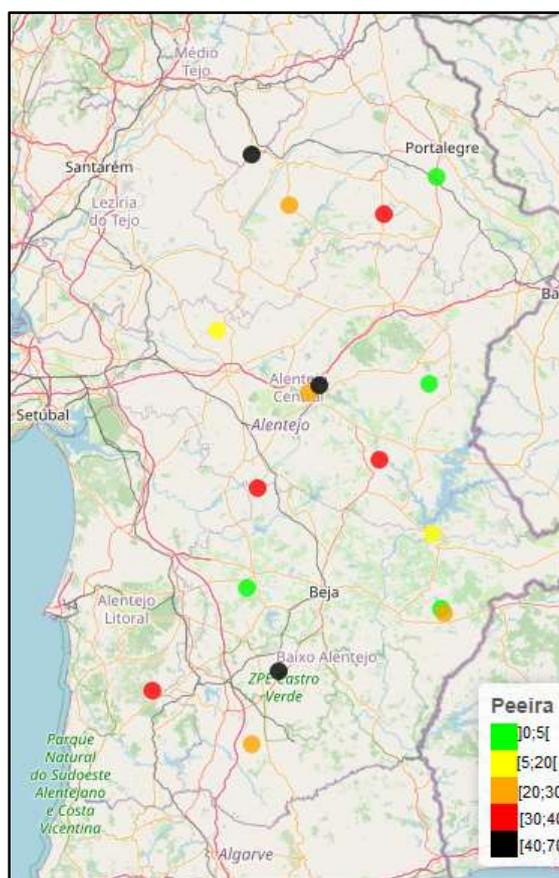


Figura 5.10 – Localização geográfica das explorações de acordo com as classes de prevalência

## 5.4 – Discussão

Iniciamos esta secção referindo algumas das limitações que afetaram a forma como este estudo se desenrolou, as quais naturalmente poderão comprometer alguns dos resultados alcançados. Na realidade, o presente trabalho, como acontece em muitos trabalhos de campo desta natureza, não pôde ser desenvolvido plenamente da forma que tinha ficado planeado. Um dos aspetos que teve de ser alterado foi o número de visitas a cada exploração, já que estavam programadas três visitas a cada exploração e, por motivos vários, só puderam ser efetivamente realizadas duas visitas. A razão maior para esta alteração teve a ver com o facto de o início das visitas ter sido atrasado face à calendarização prevista, em virtude de o Outono nos anos 2016 e 2017 se ter revelado excecionalmente seco, apresentando registos de precipitação muito inferiores aos que tinham sido verificados nos anos transatos. Em termos práticos, tornou-se então necessário protelar o início das visitas por um período superior a dois meses, não tendo sido possível principiar no mês de outubro, tal como estava calendarizado no cronograma inicial, mas apenas em dezembro de 2016 e janeiro de 2018.

Nas circunstâncias verificadas, caso se tivesse optado pela realização das terceiras visitas, as mesmas iriam decorrer em pleno Verão. De forma lógica, e de acordo com os dados apresentados no Capítulo 4, essa estação do ano não proporciona as condições climatológicas favoráveis para a expressão da doença, sendo pouco expectável que se conseguissem observar lesões severas de peeira. Tendo em conta que estava definido que as recolhas de material biológico, para identificação de agentes microbianos, só ocorreriam na última monitorização de cada efetivo, isso implicaria que se realizassem as biópsias digitais em alturas pouco favoráveis para a expressão da doença, o que poderia comprometer os resultados atingidos. Adicionalmente, as temperaturas ambientais elevadas que se sentem no Alentejo durante o Verão desaconselham a realização deste tipo de procedimentos práticos, até por questões relacionadas com o bem-estar animal e dos próprios operadores.

Outro dos aspetos que não correu tal como havia sido projetado inicialmente, resultou da impossibilidade de manter períodos temporais idênticos entre as duas visitas em cada exploração. Tal situação deveu-se a aspetos de natureza organizativa e logística no agendamento das visitas, ligados à necessidade de conjugar a disponibilidade de cada produtor, os ciclos de planeamento reprodutivo de cada exploração e as condições meteorológicas efetivamente verificadas. Assim, nem sempre foi possível obter um espaçamento temporal entre visitas uniforme para o conjunto das explorações. Não obstante, se omitirmos os valores extremos do intervalo de tempo entre as visitas (37 e 129 dias), verificamos que os restantes intervalos não se distanciaram de forma excessiva do valor médio, o qual que correspondeu sensivelmente a dois meses e meio.

A escolha das explorações para integrar este projeto decorreu sensivelmente da forma que havia sido estabelecida, tendo sido possível assegurar uma boa distribuição pela

vasta área do Alentejo, tal como anteriormente evidenciámos. O aspeto menos conseguido no que respeita à localização territorial das unidades pecuárias envolvidas no estudo teve a ver com o facto de a sub-região Alentejo Litoral ter ficado representada no estudo apenas por uma exploração (M). O motivo que originou esta situação foi a renúncia à participação no estudo de um proprietário de uma unidade sediada em Grândola. Esta desistência ocorreu mesmo após já ter sido concluída a primeira visita à referida exploração, impedindo a sua substituição em tempo útil. Caso tal não tivesse ocorrido, teríamos a NUTS III Alentejo Litoral representada por duas explorações. Nessa situação já teríamos uma amostra mais ajustada, uma vez que essa sub-região é a que ocupa uma menor extensão geográfica e aquela em que a produção pecuária apresenta uma menor relevância, tendo em conta o conjunto da região Alentejo.

O facto de ter sido avaliado um número elevado de explorações revelou-se importante para que a análise global dos resultados não fosse influenciada pelo peso de cada exploração, tal como tinha sido constatado no estudo desenvolvido por Angell *et al.* (2015), em que só foram tratadas seis explorações. Assim, foram avaliados rebanhos de ovinos que estiveram expostos a diferentes formas de manejo e distintas condições ambientais, aspetos que são relevantes para a adequada representatividade da amostragem da população ovina do Alentejo, com particular enfoque na produção das raças autóctones merina preta e branca. A par do número elevado de explorações estudado, também foi possível observar um conjunto de animais muito significativo (n=1910). Para a larga maioria destes (cerca de 78%) foi possível classificar as suas lesões em dois momentos distintos, o que equivale, em média, à observação de 87 ovinos em cada exploração, correspondendo a um valor expressivo em estudos desta natureza.

Realçamos também que a forma como este estudo foi implementado permitiu estimar a prevalência da doença nas explorações de forma direta, uma vez que o método de seleção de animais a incluir na pesquisa derivou de um processo de escolha totalmente aleatório dentro dos grupos de animais que foram disponibilizados. Este procedimento permitiu que não tivéssemos de lidar com as mesmas limitações apontadas no estudo de Angell *et al.* (2018), já que os autores utilizaram uma estratégia de seleção não randomizada, por forma a maximizar a observação de ovinos com claudicação. O aspeto menos conseguido decorrente do procedimento que adotámos teve a ver com o facto de não ter sido possível observar qualquer macho em algumas explorações, uma vez que estes se encontravam separados do restante efetivo.

A prevalência calculada, com base no total de observações, foi de 14,9%. Contudo, não podemos assumir que se trate de uma prevalência generalizável para a região, uma vez que temos de ter em consideração que a estrutura deste estudo não incluiu explorações que não tivessem reportado casos de peeira. Ainda assim, e tendo em conta que no Capítulo 3 calculámos que a prevalência de peeira ao nível das explorações se situa nos 34,5% poderemos adiantar que, durante os meses em que foram realizadas as visitas às

explorações, cerca de 5% do total de ovinos do Alentejo poderiam, em cada momento, estar afetados por peeira. Recordamos, ainda assim, que o cálculo deste valor tem por base a premissa, que não foi validada neste trabalho, de que as explorações cujos proprietários afirmam não haver casos de peeira nas suas explorações, não apresentam de facto qualquer caso desta afeição nos seus efetivos. Tendo em conta que não se realizou qualquer averiguação nas explorações que teoricamente não estarão afetadas por peeira, apenas poderemos realizar uma estimativa desse valor. Para podermos obter um valor de prevalência que se aproximasse da realidade regional seria necessário desenvolver uma metodologia diferente daquela que foi implementada neste trabalho, sendo também imprescindível considerar as explorações que tenham respondido que não possuíam a doença nos seus rebanhos.

As frequências relativas obtidas para os anos 2017 (14,87% com IC 95% [13,22; 16,67]) e 2018 (14,97% com IC 95% [13,02; 17,13]) foram bastante similares, não evidenciando qualquer diferença estatisticamente significativa ( $\chi^2=0,007$ ; valor  $p = 0,9357$ ). Verificamos também que em ambos os anos se registou uma tendência de aumento da frequência de infeção entre a primeira e a segunda visitas, o que nos leva a estimar que o efeito relacionado com as condições climáticas da Primavera tenha uma ação positiva em termos de expressão clínica desta doença, já que foi nesta estação do ano que decorreu a maioria das segundas visitas. Porém, observámos um padrão de evolução do número de lesões muito mais marcado no ano de 2018. De facto, se no primeiro ano de estudo a variação entre a proporção de animais que apresentava lesões de peeira na primeira (13,8%) e segunda (16,4%) visitas não exibiu uma diferença estatisticamente significativa ( $\chi^2=2,567$ ; valor  $p = 0,1091$ ), no segundo ano a diferença foi muito mais marcada, com as percentagens a variarem desde 6,3 até 23,7% ( $\chi^2=83,944$ ; valor  $p < 0,001$ ).

Analisando a distribuição das lesões pelos quatro membros, obtivemos uma repartição idêntica entre os antímeros esquerdo e direito, mas o mesmo não se verificou para os membros torácicos e pélvicos. Apesar de 60% do peso dos ovinos ser suportado pelos membros anteriores (Grogono-Thomas & Johnston, 1997), os nossos dados detetaram uma ligeira superioridade na prevalência de lesões nos membros posteriores (58,2%). Esta diferença é similar à que já havia sido reportada por Kaler (2008) e por Duncan *et al.* (2012), sendo que nesses estudos os valores obtidos foram 53 e 61,4% respetivamente, situando-se o nosso resultado numa posição intermédia. Assim, podemos presumir que o facto de os membros torácicos dos ovinos suportarem um maior peso corporal não os torna mais suscetíveis ao desenvolvimento destas lesões podais, sendo os membros pélvicos aqueles que mais frequentemente exibiram lesões de peeira. Uma situação idêntica a esta tem sido verificada nos bovinos leiteiros, em que o suporte do peso se distribui maioritariamente pelos membros anteriores, mas há uma maior prevalência de lesões podais nos membros posteriores (Solano *et al.*, 2016).

Passando a avaliar apenas os animais que estavam afetados por peeira, verificámos que 61,2% dos animais tinham um membro afetado por peeira, tendo os valores relativos a dois, três e quatro membros correspondido a 23,4, 9,7 e 5,7%, respetivamente. Como é natural estes valores são decrescentes, mas ainda assim verificamos que a proporção de ovinos que apresentaram lesões em três e quatro membros simultaneamente não foi menosprezável. Esta conclusão não é convergente com os resultados reportados por Kaler (2008), em que a autora não observou qualquer animal com lesões de peeira em três ou quatro membros na mesma observação. No seu estudo, a autora registou que cerca de 10% dos animais com lesões de peeira tinha dois membros afetados em simultâneo, correspondendo os restantes 90% a animais com um único membro afetado. Assim, a autora não observou nenhum animal que tivesse mais do que dois membros lesionados, contudo na amostra que suportou o nosso estudo foram observados 72 animais que, em pelo menos uma das visitas, tinham no mínimo três membros com lesões de peeira. Apesar de serem tendências divergentes temos de recordar que no nosso trabalho foram observados 513 ovinos com alguma lesão de peeira (grau  $\geq 2$ ), enquanto o trabalho de Kaler (2008) incluiu apenas 62 animais com essas lesões, pelo que a amostragem considerada no nosso trabalho foi mais robusta, indiciando uma maior fiabilidade das conclusões alcançadas.

Existe uma forma alternativa de estimar a variável de resposta, a qual se concretiza pelo cálculo do *score acumulado*, tal como foi implementado nos ensaios de Nieuwhof *et al.* (2008). Porém, não nos pareceu pertinente aplicá-la à totalidade dos dados, uma vez que, no limite, um *score acumulado* de 4 poderia corresponder a um animal com lesões de *score* 1 nos quatro membros, sendo que o mesmo resultado pode ser obtido por um animal que tenha apenas um membro afetado com grau 4. Ora, se no primeiro caso estamos perante uma situação em que ainda não classificamos o animal como afetado por peeira, por se tratarem de lesões de dermatite interdigital pouco severas, na segunda já estamos a referir-nos a um animal que exhibe uma lesão com a severidade máxima. Resulta claro que os dois casos são claramente distintos em termos do estatuto clínico da doença, pelo que não nos pareceu adequado utilizar um critério que com facilidade induz a um erro de análise. Deste modo, resolvemos utilizar a variável de resposta *score acumulado* apenas para os casos em que existiam lesões de peeira em três ou quatro membros, tendo sido detetadas 79 observações que cumpriam esses requisitos. Para os casos em que três membros apresentavam lesões de peeira, os *scores acumulados* mais prevalentes foram 8 (n=20) e 7 (n=14), enquanto que nos animais em que os quatro membros apresentavam lesões o *score* mais recorrente foi 10 (n=8). Para reforçar a real gravidade que esta doença pode atingir nos animais podemos referir que os valores de *score acumulado* máximos foram 12 e 14, respetivamente para os animais com três e quatro membros afetados simultaneamente, valores impressionantes que realçam a severidade que a peeira pode alcançar nas suas manifestações mais austeras.

São vários os potenciais fatores de risco para a peeira, sendo o sexo dos animais um dos aspectos tratados pela literatura. Para o conjunto dos animais testados, detetámos que a prevalência da doença nos carneiros foi quase quatro vezes superior àquela que registámos para as ovelhas. Tendo como comparação os trabalhos realizados por Raadsma & Egerton (2013), os nossos resultados estão em conformidade com o padrão descrito pelos autores, já que também eles reconheceram que os machos apresentavam um risco superior de estarem infetados. Adicionalmente, aqueles autores avançaram que a disparidade em termos de análise do sexo do animal ocorria, não só na percentagem de animais afetados, mas também na maior gravidade das lesões exibidas pelos machos. Também neste aspeto as nossas observações apontam nesse sentido, já que 25% dos carneiros observados apresentaram lesões com um grau superior ou igual a 3, enquanto o valor correspondente para as fêmeas se cifrou nos 5,5%, sendo esta diferença estatisticamente significativa ( $\chi^2=43,215$ ; valor  $p < 0,001$ ).

Esta característica distintiva sobre a predisposição à doença parece estar relacionada com o comportamento sexual dos machos, que os leva a percorrer maiores distâncias em busca de ovelhas recetivas durante a época de cobrição, facto que, como reconhece Woolaston (1993), os tornará mais expostos à doença. A superior severidade das lesões nos carneiros poderá ser ainda justificada pelo seu maior peso corporal, o que provoca uma maior pressão nas úngulas, e conseqüentemente, propiciará o aparecimento deste tipo de lesões. De facto, Woolaston (1993) refere explicitamente que o peso vivo dos animais e as características físicas dos seus cascos constituem-se como fatores relevantes para os tornar suscetíveis à doença, o que está em linha com a hipótese que antes referimos. Ainda assim convém ter em consideração que, em virtude da grande disparidade entre o número de machos e fêmeas englobados no nosso estudo, pelas razões anteriormente descritas, seria conveniente replicar esta análise no contexto de uma amostra superior no que respeita aos carneiros.

Colocando agora o nosso foco na idade dos animais, verificamos que a literatura empírica tem registado que quanto maior a idade do ovino, maior a probabilidade de já ter contactado com a bactéria *D. nodosus* ao longo da sua vida, o que justifica que os borregos exibam uma menor suscetibilidade de estarem afetados pela doença do que os animais adultos (Nieuwhof *et al.*, 2008; Angell *et al.*, 2015; Angell *et al.*, 2018). Ora, esta situação sugere que a competência imunológica, que não terá sido ainda atingida nos borregos, não desempenhe um papel tão preponderante como acontece com outras doenças (Woolaston, 1993). Apesar de a nossa amostra não ter contemplado borregos, por serem animais que ainda não estão registados na base de dados do IFAP, os nossos resultados evidenciam também a mesma linha de tendência, uma vez que as idades superiores dos animais coincidem com maiores proporções de lesões de peeira. A única exceção verificada, ocorreu entre as duas classes etárias mais elevadas (idade entre 4 e 8 anos e idade superior a 8 anos) onde não foi registado um aumento da proporção de animais lesionados, dado que os valores respetivos a essas categorias foram 19,8 e

18,2% ( $\chi^2=0,578$ ; valor  $p = 0,4471$ ). Eventualmente, o facto de não ter ocorrido um aumento da prevalência de infeção na classe com idade mais elevada, conforme o padrão verificado nas faixas etárias inferiores, poderá estar relacionado com o facto de os ovinos com uma idade mais avançada apresentarem um endurecimento bastante marcado das úngulas (Woolaston, 1993), o que dificultará a penetração dos agentes bacterianos.

Um outro aspeto que tivemos em conta foi a forma como a prevalência da doença é influenciada pela raça dos animais. Os dados recolhidos nos testes estatísticos permitem confirmar a existência de uma predisposição racial para a resistência a esta doença, tal como já tinha sido reconhecido no estudo de Emery *et al.* (1984), não obstante as raças aqui avaliadas terem sido diferentes das que foram tratadas no nosso ensaio. No citado estudo, os autores constataram que os ovinos de raça merina eram mais suscetíveis à doença do que aqueles pertencentes às raças de ovinos mais comuns no Reino Unido. As duas variedades da raça merina utilizadas nesse ensaio foram a *saxon* e a *peppin*, que constituem raças produtoras de lã por excelência (Saul *et al.*, 1993). Estas raças derivam de um ancestral que é comum às raças puras consideradas no nosso estudo, a merina branca e preta, que são duas das principais raças de ovinos em Portugal (Landi *et al.*, 2019), com especial destaque no Alentejo (Carolino *et al.*, 2019).

Os dados observados permitem-nos constatar que a prevalência de lesões em animais de raça merina preta, integrados no correspondente livro genealógico, foi bastante reduzida, não tendo ultrapassado 2,3% dos animais caracterizados. Por comparação direta destes valores com os obtidos para a raça merina branca e para os animais classificados como tipo merino verificamos que a possibilidade de um destes animais apresentar lesões de peeira é respetivamente cerca de seis e doze vezes superior, tendo a raça merina preta como base da análise. Se no caso dos animais tipo merino podemos argumentar que a respetiva classificação se baseou exclusivamente na observação de características fenotípicas, não tendo por base qualquer avaliação genética específica, o mesmo não acontece para as raças merina branca e preta, em que todos estes animais são submetidos a provas de avaliação genética que confirmam a sua genealogia. Esta indicação é fulcral para que possamos afirmar que no Alentejo os ovinos de raça merina preta apresentam uma menor vulnerabilidade para a peeira.

Para conferir a adequação da nossa análise, podemos dissecar com maior detalhe os resultados obtidos para as explorações A e B que, tal como já referido, correspondem em termos práticos à mesma exploração, sendo que na primeira estão apenas animais da raça merina preta, enquanto na segunda os ovinos são exclusivamente da raça merina branca. Dado que os animais de ambos os lotes estão sujeitos ao mesmo contexto edafoclimático e tipo de manejo, o único fator distintivo foi precisamente a raça dos animais. Ora, entre os animais da raça merina preta verificou-se que na primeira visita apenas 2,1% apresentavam lesões de peeira de *score* 2, enquanto na

segunda visita nenhum dos animais exibiu qualquer lesão compatível com a doença. No caso da raça branca, as percentagens de animais com lesões de peeira nas primeira e segunda observações foram 18,3 e 8,9% respetivamente. Se considerarmos ainda o grau de severidade da doença, verificou-se que na exploração B observámos três animais com lesões consideradas severas (dois com lesão de *score* 3 e um com a severidade máxima), enquanto na exploração A nenhum ovino apresentou tais categorias lesionais.

Podemos deste modo afirmar que os dados recolhidos neste trabalho apontam para a existência de diferenças estatisticamente significativas entre a suscetibilidade para a peeira nas raças de ovinos do Alentejo, sendo que a merina preta aparenta ostentar uma superior resistência à doença. cremos que esta evidência possa estar relacionada com o facto de as úngulas dos animais desta raça serem pigmentadas, o que provavelmente constituirá um fator de proteção face à colonização das bactérias envolvidas na patogénese da peeira, algo que não acontecerá nos animais de raça merina branca já que não possuem pigmentação nas unhas. Todavia, isto é apenas uma mera hipótese indicada pela pesquisa, a qual, naturalmente, carece de estudos adicionais que permitam averiguar com maior rigor e profundidade esta situação. A análise comparativa do genoma das duas raças também poderá revelar respostas interessantes para o eventual estabelecimento de um programa de seleção de ovinos reprodutores resistentes à peeira.

Focaremos agora a análise na averiguação de eventuais diferenças nos índices da doença ao longo das fases do ciclo produtivo das fêmeas. Das observações recolhidas podemos constatar que não ocorreram diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos mais representados na amostra, ou seja, entre as ovelhas em pós-parto e aquelas que se encontram em época de cobrição ou que eventualmente já estejam gestantes. Todavia, no que respeita às ovelhas alfeiras, que não se encontram a criar qualquer borrego, verificou-se que a probabilidade de apresentarem lesões de peeira foi mais do dobro da evidenciada em qualquer um dos restantes grupos. Este resultado é aparentemente contraditório ao referido por McLaren *et al.* (2008), os quais constataram que as ovelhas alfeiras e aquelas que estavam a criar um borrego apresentaram uma percentagem de infeção idêntica. Por seu turno, as fêmeas que estavam a amamentar dois ou mais borregos revelaram uma maior suscetibilidade para a infeção por peeira, provavelmente devido a uma maior sobrecarga a que está sujeito o seu sistema imunitário.

No nosso trabalho, apesar de não termos tido acesso ao registo do número de crias de cada ovelha, obtivemos indícios que nos assinalam que as ovelhas alfeiras apresentavam maior taxa de infeção. Porém, devido ao menor número de observações realizadas em animais integrados nesta classe (cerca de 2,5% do total de animais observados), os resultados não devem ser valorizados em demasia. Consideramos mesmo recomendável que numa pesquisa posterior, com o objetivo específico de aferir se o

ciclo produtivo dos animais influencia a propensão àquela doença, o universo de animais testados apresente um maior equilíbrio entre as várias classes, o que não aconteceu neste caso já que a amostragem foi aleatória dentro do efetivo total. Ainda assim, podemos considerar a possibilidade de as ovelhas terem passado para o grupo das alfeiras em virtude de já se encontrarem fisiologicamente debilitadas porque poderiam estar clinicamente afetadas por peeira. Relembramos que as fêmeas podem alcançar a condição de alfeiras caso abortem numa fase tardia da gestação ou por morte do borrego após o parto. Naturalmente que esta é apenas uma possível justificação que avançamos, já que para avaliar o real efeito do estado produtivo na infeção por *D. nodosus* teremos de efetuar um estudo longitudinal com base num maior número de observações de cada animal. A par, seria necessário dispor de informação sobre o calendário reprodutivo de cada exploração sendo necessário dispor de dados como a data de parto ou o número de borregos nascidos e criados. Mais, o referido ensaio obrigaria a que fossem realizados diagnósticos de gestação, por via ecográfica, que confirmassem efetivamente o estatuto reprodutivo das ovelhas em cada observação, algo que não foi feito no nosso trabalho.

Os estudos realizados sobre ovinos evidenciam a existência de uma elevada correlação entre os valores referentes à condição corporal e ao peso vivo do animal (McHugh *et al.*, 2018). Ora, o facto de mais de 1/3 dos animais terem apresentado valores de condição corporal inferiores aos mínimos recomendados para os ovinos ( $\leq 2$ ) (Wassink *et al.*, 2010a) revela de forma impressionante que uma proporção significativa de animais apresentava um peso inferior ao desejável para fins produtivos e reprodutivos. Os animais com estas características encontravam-se numa situação de carência nutricional, a qual decorreria eventualmente de uma insuficiente ingestão de nutrientes, mormente no que diz respeito aos teores de proteína e energia necessários (Ramos *et al.*, 2018). Esta possibilidade é reforçada devido ao facto de se ter verificado uma melhoria significativa dos valores de condição corporal entre as duas visitas, já que a maioria das segundas visitas decorreu na Primavera. Esta estação corresponde ao melhor período para o desenvolvimento das pastagens naturais, já que as mesmas crescem de forma abundante no clima mediterrânico (Landau *et al.*, 2005), situação que é particularmente notada no Alentejo. Como Ramos *et al.* (2018) reconhecem, durante os restantes períodos temporais o valor nutritivo das pastagens naturais é insuficiente para suprir as necessidades dos ovinos, daí que muitas vezes se torne indispensável o recurso à suplementação alimentar. Assim, cremos que o fator alimentação disponível se sobreponha relativamente à importância que a peeira desempenha na condição corporal exibida por cada animal. Acreditamos que esta seja a principal justificação para o facto de não ter sido identificada a relação expectável entre a diminuição da condição corporal e o aumento da severidade das lesões de peeira, tal como havia sido avançado por Witt & Green (2018). A evidência referida por estas autoras deve-se, de forma lógica, ao facto de os animais infetados por *D. nodosus* terem maiores dificuldades de locomoção, devido à claudicação que pode revelar-se bastante austera (Best *et al.*,

2020). Esses animais estarão assim em desvantagem, relativamente aos saudáveis, no que respeita à procura de alimento nas explorações com um regime extensivo (Abbott & Lewis, 2005), como ocorre maioritariamente no caso do Alentejo.

No que se refere aos parâmetros sanguíneos avaliados, não parece que estes possam ser utilizados de forma precisa como indicadores de diagnóstico ou prognóstico para esta doença, apesar de ter sido identificada uma correlação negativa entre o hematócrito e a presença de lesões de peeira. Contudo, apesar do hematócrito médio dos animais afetados ter sido inferior (30,9%) ao exibido pelos animais saudáveis (32,1%), verificamos que ambos os valores estão enquadrados nos parâmetros de referência descritos para a espécie (Wilhelmi *et al.*, 2012), sendo que por norma os valores de hematócrito só estarão associados a situações de anemia quando se encontram abaixo de 27% (Di Loria *et al.*, 2009). Podemos assim assumir que será pouco provável que a peeira seja a responsável por uma situação de anemia, sendo que outras causas poderão ser mais facilmente atribuídas a essa condição patológica, onde se destaca por exemplo o nível de parasitismo (Katsogiannou *et al.*, 2018).

Abordando agora os fatores climáticos que podem influenciar a expressão clínica da peeira, podemos assumir que no Alentejo a temperatura média e a precipitação têm importância relativa muito distintas, apesar de vários estudos adiantarem que ambos os fatores são determinantes para a capacidade de sobrevivência do agente *D. nodosus* (Graham & Egerton, 1968; Green & George, 2008; Atia *et al.*, 2017). Assim, as condições meteorológicas efetivamente registadas no período que antecedeu as visitas a cada uma das explorações contempladas foram comparadas, através de uma correlação linear, com a percentagem de animais de cada exploração que apresentou lesões de peeira em cada visita. Esta análise revelou que, no caso da temperatura diária média, não existiu qualquer tipo de associação com significância, mas no caso da precipitação foi detetada uma correlação positiva estatisticamente significativa, tal como era expectável. Deste modo, podemos reforçar a hipótese de que o nível de pluviosidade parece constituir-se como o fator ambiental que desempenha um papel mais relevante na patogénese da peeira, o que está em conformidade com a tendência que tínhamos detetado no decurso do Capítulo 4. Para dar suporte a esta conclusão geral, procedemos a uma análise comparativa entre os valores de precipitação acumulada, registados nos períodos que antecederam as visitas, e as percentagens de animais clinicamente afetados na visita correspondente. O resultado dessa análise revelou que em 15 das 17 explorações se registou o padrão esperado, ou seja, as visitas ocorridas após o período em que as explorações estiveram expostas a uma precipitação superior foram aquelas em que se registou uma maior proporção de ovinos com lesões de peeira. As duas únicas exceções a esta tendência foram assinaladas nas explorações C e H, sendo que aí acreditamos que algum fator relacionado com o manejo se tenha sobreposto ao efeito causado pela pluviosidade.

Relativamente ao modelo multifatorial construído para prever a probabilidade de existência de lesões de peeira, o mesmo combina variáveis individuais e outras que foram determinadas pelas características da exploração em que cada ovino se insere. No modelo final foram retidas 13 variáveis, tendo algumas registado valores que vêm em linha com o que seria o resultado expectável, existindo, ainda assim, outras que exibiram tendências diferentes daquilo que seria previsível.

Começando a análise pelos fatores individuais, podemos assumir que os resultados obtidos seguiram, de forma integral, as conclusões que foram obtidas na análise univariada já apresentada neste capítulo. Assim, quer o facto de um animal ser macho ou de apresentar uma idade mais avançada revelaram-se como fatores agravantes para a possibilidade de um animal exibir lesões de peeira. No caso da outra variável individual, os ovinos de raça merina preta apresentaram uma menor probabilidade de terem peeira, enquanto os que foram classificados como tipo merino mostraram um risco agravado de exibirem as lesões podais características da doença. A variável merina branca exibiu um valor *p* que não se revelou significativo, o que denota que não foram detetadas diferenças estatísticas entre essa classe e os animais de raça *cruzada*, já que recordamos ter sido essa a categoria que serviu de base comparativa para as restantes. Refira-se que, já na análise univariada estas duas categorias tinham apresentado uma prevalência intermédia entre as reveladas pelas classes merina preta e tipo merino. Podemos, então, concluir que todos os resultados exibidos pelos fatores individuais já tinham sido demonstrados na análise univariada, o que confere uma maior solidez à investigação e corrobora os efeitos que cada uma das variáveis produz na probabilidade de expressão clínica de peeira.

Avaliando agora os fatores de grupo, e começando pelos aspetos climáticos, apenas a precipitação foi integrada no modelo final, seguindo os mesmos resultados que já haviam sido referidos, quer neste capítulo quer no anterior. Este é assim mais um dado que corrobora que a pluviosidade se assume como o fator climático que desempenha o papel mais relevante na patogénese da doença no Alentejo.

No caso das ações profiláticas e terapêuticas que são usadas no controlo da peeira, duas das três variáveis incluídas inicialmente foram mantidas no modelo final. Uma delas, a *separação dos animais afetados*, também já tinha apresentado um coeficiente negativo e estatisticamente significativo na análise desenvolvida no Capítulo 3. Esta situação comprova que estamos efetivamente perante um fator que confere um efeito protetor para os animais submetidos a este procedimento. De forma lógica, esta conclusão está de acordo com as indicações expressas na literatura empírica, tal como evidenciaram as pesquisas de Green & Clifton (2017) e Zingg *et al.* (2017). A outra variável que exibiu uma correlação negativa com a variável resposta foi a *vacinação*. Este resultado também surge de forma expectável, uma vez que, tal como descrito por Liardet *et al.* (1989), a vacina confere um efeito protetor nos ovinos sujeitos à sua aplicação. O protocolo

vacinal implementado nestas explorações utiliza uma vacina comercial multivalente e, tal como será abordado em detalhe no Capítulo 6, a mesma apresenta algumas limitações. Ainda assim, o resultado obtido é inequívoco e confirma que esta prática reduz a probabilidade de os ovinos exibirem lesões de peeira.

Vamos finalizar a análise com a avaliação dos fatores diretamente relacionados com a exploração e com o manejo aplicado, sendo que entre as 13 variáveis inicialmente incluídas apenas cinco foram retidas no modelo final. Duas delas, a *área destinada aos animais* e a *estabulação*, exibiram um coeficiente positivo, pelo que se encontram diretamente relacionadas com a ocorrência de lesões de peeira. Assim, podemos concluir que os ovinos inseridos em herdades com maior área estão mais propensos a serem afetados pela doença, seguindo a mesma tendência que havia sido identificada no Capítulo 3. Neste modelo, a variável *estabulação* também foi novamente identificada como potencial fator de risco, estando em concordância com os trabalhos de Green & George (2008) e Kaler & Green (2009).

As restantes três variáveis relacionadas com a exploração que apresentaram significância na análise estatística (*Efetivo*, *Pastoreio em regadio* e *Má drenagem do terreno*) têm um coeficiente negativo, o que significa que a sua verificação reduz a probabilidade de cada animal apresentar lesões de peeira. De forma sintética, estas variáveis apresentam assim um resultado aparentemente divergente do que seria expectável, pois as mesmas constituem fatores de risco, conforme atestado pela literatura empírica sobre a temática. No caso da dimensão do efetivo, o resultado obtido neste modelo é aparentemente contraditório com o obtido no Capítulo 3, levando por isso a uma conclusão diferente da apresentada em Angell *et al.* (2018). Ainda assim, esta situação poderá ser justificada, pois um dos critérios de seleção destas explorações foi a presença de um efetivo mínimo de 100 ovinos adultos em cada rebanho. Desta forma, o conjunto das 17 explorações encontra-se inevitavelmente orientado em favor dos efetivos de maior dimensão. Assim, entende-se que este resultado não pode ser extrapolado para a generalidade das explorações, visto não ter sido considerada qualquer exploração com efetivos de dimensão reduzida.

Outra variável que apresentou um resultado contrário ao obtido no Capítulo 3 foi a *má drenagem do terreno*, seguindo também uma tendência diferente da descrita em Raadsma & Egerton (2013). Esta situação deve-se, presumivelmente, ao facto de estarmos a referir-nos a um fator que envolve uma resposta subjetiva. Tal como referido previamente, o facto de existirem terrenos com elevada heterogeneidade no que diz respeito à capacidade de drenagem pode ter contribuído para que os produtores tivessem dificuldade em responder de forma assertiva a esta questão. Podemos assim assumir que o resultado obtido pela variável não deva ser sobrevalorizado.

Por fim, também o *pastoreio em áreas com regadio* exibiu um resultado divergente daquele que seria previsível. Os trabalhos de Angell *et al.* (2018) revelaram que a

pastagem nessas áreas apresenta uma superior capacidade de retenção de humidade, conferindo assim as condições ideais para a disseminação de *D. nodosus* (Raadsma & Egerton, 2013). Todavia, os dados recolhidos na nossa análise não demonstraram o mesmo tipo de relação no Alentejo, uma vez que na análise desenvolvida no Capítulo 3 também não se conseguiu identificar a presença de áreas de regadio como um potencial fator de risco. Podemos, ainda assim, adiantar que para obter uma análise fidedigna e que não deixasse qualquer margem para dúvidas seria necessário que tivesse ocorrido um cruzamento dos dados referentes aos períodos em que os ovinos tinham pastoreado nas áreas de regadio com as datas das visitas. Infelizmente não se recolheu tal informação, mas cremos que este assunto deverá ser merecedor de uma futura análise.

De forma resumida, o referido modelo multivariado apresentou uma precisão global elevada (85,1%), tendo tal resultado sido bastante impulsionado pela grande capacidade de previsão da ausência de lesões nos animais, tal como revela o parâmetro relativo à especificidade (99,7%). A grande limitação do modelo está, evidentemente, relacionada com a reduzida capacidade de prever a existência de lesões de peira, tal como revela o baixo índice de sensibilidade (2,6%). Acreditamos que o reduzido valor deste parâmetro estará relacionado com o facto de a prevalência de doença na amostra (15%) estar consideravelmente abaixo do *cut-off* definido para o modelo (50%). Admitimos, assim, que para melhorar os parâmetros analíticos deste modelo poderá ser necessário ajustar os valores do *cut-off*, algo que poderia permitir aumentar a sua sensibilidade, mas que inevitavelmente levaria a uma redução da especificidade. Contudo, acreditamos que para conseguir criar um modelo mais ajustado seria necessário aumentar o número de observações, principalmente pela inclusão de animais provenientes de explorações em que a doença não está presente. A inclusão de explorações que não tenham casos de peira permitirá ainda avaliar um maior número de variáveis, uma vez que poderão ser contornados os problemas relacionados com a linearidade entre variáveis. Adicionalmente, também poderia ser relevante que as amostras fossem recolhidas em outras regiões, por forma a comparar os dados aí coletados com aqueles que obtivemos para o Alentejo.

Avançando para a comparação entre as diferentes explorações, os resultados deste trabalho revelaram uma grande variabilidade entre as prevalências médias estimadas para cada unidade (mínimo de 0,5% para a exploração F e máximo de 39,9% para a C), o que comprova que mesmo naquelas explorações em que ocorrem casos de peira, a dinâmica da doença é bastante diversa, tal como descrito por Smith *et al.* (2014). Assim, em cada unidade pecuária a expressão da doença depende, de forma estreita, dos fatores ambientais, dos relacionados com a própria exploração e, presumivelmente, daqueles derivados da virulência da(s) estirpe(s) de *D. nodosus* envolvida(s) (Green & George, 2008). Pela confrontação dos valores referentes às duas visitas a cada exploração, também podemos constatar que ocorreu uma variabilidade marcada, tendo o caso extremo sido verificado na exploração M. Nesse rebanho não se observou

qualquer lesão compatível com peeira durante a primeira visita, mas na segunda detetámos que 38,2% do efetivo já apresentava as referidas lesões. De forma algo curiosa, constatamos que esta exploração foi aquela em que se registaram maiores diferenças na prevalência da doença, apesar de nesta unidade terem sido realizadas as visitas espaçadas por um menor período temporal (37 dias). Esta grande variabilidade num curto período deixa bem patente a necessidade de realizar um maior número de observações em cada rebanho, por forma a compreender a real dinâmica da doença, já que a obtenção de apenas dois registos não permite compreender verdadeiramente o padrão evolutivo ao longo das estações do ano. Assim, estes dados também demonstram a importância de evitar fazer considerações sobre o estatuto da doença tendo como referência uma única observação, devido ao risco de podermos estar a subestimar a verdadeira prevalência da doença, tal como já havia sido referido nos trabalhos de Raadsma & Egerton (2013) e de Angell *et al.* (2018).

Ao analisar individualmente os resultados combinados das duas visitas, verificamos que sensivelmente metade dos animais (50,6% com IC 95% [47,02; 54,33]) não apresentaram qualquer lesão podal. Apesar de estarmos a referir-nos apenas a duas observações por animal, parece correto assumir que, perante os distintos contextos climáticos a que estiveram expostos, este conjunto de animais exibiu uma superior resistência à doença. Se pensarmos em termos de investigação futura, cremos que estes animais poderão constituir o ponto de partida para a pesquisa de marcadores genéticos que possam estar associados a uma maior resistência à peeira nas raças de ovinos existentes no Alentejo. Deste modo, criar-se-iam condições para ancorar um programa de seleção de ovinos reprodutores que exibam uma maior resistência à doença, tal como já aconteceu com sucesso em raças autóctones em países da Oceânia (Escayg *et al.*, 1997; Bishop & Morris, 2007).

Sendo útil identificar os animais mais resistentes à peeira, também será relevante que se reconheçam quais são os animais mais suscetíveis. Se considerarmos as indicações definidas para o Reino Unido, em que as respetivas autoridades sanitárias recomendam o refugio dos animais que exibem cronicamente lesões severas de peeira (Angell *et al.*, 2018), verificamos que na nossa amostra encontramos 25 animais com dois registos de lesões severas, distribuídos por oito explorações. Logicamente que este lote seria potencialmente considerado como candidatos para o refugio. Apesar de este ser um conjunto relativamente pequeno de animais (entre 1 e 6 animais por exploração), o seu refugio poderia ter um efeito importante na exploração, no que diz respeito ao controlo da doença. Refira-se que no Reino Unido a implementação desta estratégia de utilizar apenas a observação macroscópica de lesões crónicas como critério exclusivo de refugio revelou grande sucesso, sendo considerada como responsável pela eliminação de importantes reservatórios das estirpes de *D. nodosus* dentro das explorações (Angell *et al.*, 2018). Evidentemente que, antes de recomendar o refugio de qualquer animal, seria fundamental avaliar o respetivo histórico, baseado num maior número de observações

clínicas e, de forma complementar, analisar o tipo de respostas às terapêuticas que tenham sido prescritas e efetivamente implementadas.

A utilização dos critérios de atribuição do estatuto clínico de cada exploração que foram definidos por Raadsma & Egerton (2013) e por Frosth *et al.*, (2015) não parecem ter-se revelado como os mais adequados para abordar a situação existente no Alentejo. Recordemos que o critério A foi desenvolvido e aplicado na Austrália, enquanto o critério B foi desenhado especificamente para as explorações sediadas na Suécia, pelo que retratam duas realidades completamente distintas daquelas que registamos no Alentejo.

Adicionalmente, também a intensidade e a abrangência dos universos afetados nos vários contextos são aspetos a ter em conta na definição de critérios para atribuição do estatuto clínico da doença, o qual tem efeitos em termos de programas de controlo da mesma. No caso da Austrália, a importância da peira tem sido reconhecida desde há várias décadas, sendo responsável por avultados prejuízos económicos, devido ao elevado número de explorações afetadas (Dhungyel *et al.*, 2014). Assim, o simples facto de se realizar o isolamento laboratorial de *D. nodosus* nas explorações não é, por si só, suficiente para decidir sobre a implementação de um programa de controlo. Na realidade, apenas as explorações em que a doença se manifesta na sua forma virulenta são alvo de atenção por parte das autoridades sanitárias, o que equivale naturalmente a um menor dispêndio de recursos, evitando as intervenções sanitárias em situações menos severas (Raadsma & Egerton, 2013).

No que respeita à Suécia, a situação é distinta, já que o primeiro surto identificado no país ocorreu no ano de 2004 (Olofsson *et al.*, 2005), sendo que um estudo epidemiológico revelou que cerca de 5% dos animais testados exibia lesões de peira (König *et al.*, 2011). Deste modo, o critério aplicado neste país foi bastante diferente daquele aplicado na Austrália, bastando ter sido registada na exploração uma lesão para que o referido estatuto da doença tenha sido atribuído. Entende-se, assim, que as especificidades da doença são distintas conforme a situação epidemiológica em que se integram, daí que os critérios A e B sejam bastante diferentes na sua estrutura, procurando que o mesmo se ajuste ao contexto específico para o qual foi concebido.

De uma forma algo simplista, podemos referir que a aplicação do critério australiano nas explorações do Alentejo atribui aos casos mais severos o estatuto intermédio da doença, levando a que nenhuma das 17 explorações tivesse obtido a classificação máxima na sua escala (forma virulenta). De facto, como esta categoria exigia que pelo menos 10% dos animais apresentassem um *score* máximo de 4, tal não ocorreu em nenhuma das explorações, já que o valor máximo foi atingido na exploração L (4,2%). A falta de adequação deste critério à nossa realidade motivou casos algo surpreendentes, como seja, por exemplo, o facto de não ter sido atribuída à exploração C a classificação de gravidade mais elevada, quando numa das visitas esta apresentou mais de metade

do efetivo com lesões de peira, sendo que 1/3 do total dos animais evidenciou mesmo lesões consideradas como severas ( $\geq 3$ ). Assim, resulta claro que o valor mínimo para integrar a categoria mais grave ao nível da exploração é um patamar demasiado elevado para o contexto que se verifica no Alentejo, pelo que, caso as autoridades sanitárias portuguesas equacionassem a construção de uma tabela desta natureza para o propósito de combater a doença, os valores teriam que ser logicamente ajustados à realidade em causa.

Adicionalmente consideramos que, se no topo da classificação identificámos um excesso de exigência para integrar o grau máximo, também no patamar mais baixo notamos que os critérios definidos para categorizar a forma benigna são bastante rigorosos, já que três das explorações avaliadas nem chegam a atingir o patamar mais baixo (forma benigna), não obstante terem revelado algumas lesões com *score* 2. Deste modo, também aqui consideramos que os valores mínimos desta categoria deveriam ser inferiores de forma a poderem adequar-se ao contexto epidemiológico do Alentejo, já que clinicamente foi possível observar lesões características de peira nas três explorações em causa.

No caso da utilização dos padrões definidos no critério B no nosso estudo, pudemos constatar que a sua aplicação aos dados recolhidos neste trabalho também não pareceu ser a mais ajustada. Podemos mesmo referir que esse critério, ao contrário do anterior, revelou ser pouco exigente, já que a deteção de um único animal com uma lesão de *score* 2 ou 3 será suficiente para que o estatuto sanitário de toda a exploração atinja o nível 3 ou 4, respetivamente. Se tal critério pode ser adequado para o contexto sueco, cuja dimensão média do efetivo das explorações se cifra em 32 animais (Frosth *et al.*, 2015), não será de todo o mais apropriado para aplicar no Alentejo, já que os rebanhos têm efetivos com uma dimensão substancialmente superior. De facto, os valores disponibilizados pelo INE revelam que o efetivo médio nas explorações de ovinos no Alentejo ronda os 135 animais (INE, 2017), mas no caso da amostra recolhida no Capítulo 3 obtivemos um valor médio ainda maior (273 animais). Deste modo, acreditamos que o mais adequado para construir de forma correta um critério para atribuição do estatuto sanitário para o Alentejo seja mesmo definir valores percentuais em relação ao efetivo, tal como acontece no critério A, ao invés de definir um valor absoluto como padrão.

Podemos então concluir que a aplicação direta dos padrões australianos ou suecos, ou quaisquer outros, não corresponderá a uma forma coerente de abordar a problemática, sendo necessário realizar a devida calibragem nos valores padrão para cada categoria, de forma a que seja estabelecido um critério válido para as explorações de ovinos do Alentejo. Ainda assim, e apesar de não ser objetivo deste trabalho apresentar uma definição sobre esses valores padrão, acreditamos que os critérios A e B poderão constituir um ponto de partida para que se alcancem padrões adaptados ao Alentejo, sendo plausível pensar que os mesmos se possam situar numa posição intermédia entre

os dois critérios que serviram de base ao nosso estudo. Pretendemos, ainda assim, reforçar a ideia de que a extrapolação destes critérios para o Alentejo tem potencial para fornecer algumas informações que sejam relevantes para diferenciar o estatuto clínico nas explorações, mas esses dados terão de ser analisadas de forma integrada com as restantes evidências fornecidas por outros parâmetros.

Nesta perspetiva, e tendo em conta que ainda não foram definidos os valores padrão ajustados ao contexto epidemiológico do Alentejo, resolvemos comparar as explorações diretamente entre si, tendo por base os valores percentuais acumulados de ovinos que apresentaram lesões de peeira em alguma das observações efetuadas, cujos resultados estão sintetizados na Tabela 5.31. As explorações que registaram uma menor taxa de animais afetados (< 5%), e que presumivelmente são aquelas em que a peeira dispõe de menores condições para se expressar, foram a A, D, F e K, sendo que nas três primeiras não foi mesmo observada qualquer lesão severa da doença. No extremo oposto, temos as explorações C, J e O, nas quais a percentagem acumulada de animais com lesões de peeira superou os 40%. Ainda assim, a exploração C destaca-se claramente das demais, pelo que terá de ser referida de forma particular. Esta exploração foi a única a registar prevalência superior a 55% (65,59% com IC 95% [50,17; 84,25]) e a superar a fasquia dos 20% dos animais com lesões consideradas severas (37,6% com IC 95% [26,21; 52,34]). Refira-se, por exemplo, que no ensaio desenvolvido por Conington *et al.* (2008) em explorações do Reino Unido, o valor máximo detetado numa exploração foi de 59%, sendo que a prevalência registada na exploração C supera mesmo esse registo. Deste modo, podemos concluir que esta foi a exploração, entre as 17 consideradas, mais severamente afetada por peeira. As restantes dez explorações situam-se numa posição intermédia entre estes dois patamares extremos, embora não estejam todas na mesma situação, já que aí foram encontradas diferentes combinações entre a percentagem de lesões de peeira e de lesões severas.

## 5.5 – Conclusão

O presente trabalho foi baseado na observação clínica dos animais e confirma a relevância que a peeira desempenha em explorações de ovinos no Alentejo. Na realidade, os resultados revelam que em algumas das unidades observadas a prevalência atinge índices elevados e alarmantes, pelo que, no caso específico das explorações mais afetadas, haverá seguramente consequências gravíssimas sobre a sua produtividade e conseqüentemente na respetiva rentabilidade.

Os dados recolhidos neste ensaio poderão revelar-se de grande utilidade para transmitir informação, cientificamente validada, a qual será relevante para um melhor conhecimento das características da epidemiologia da peeira no Alentejo. Algumas dessas informações envolvem a identificação de animais que poderão constituir um

grupo de risco, a descrição das práticas de manejo que constituem fatores agravantes para a doença e a justificação das condições climáticas que favorecem a expressão clínica da doença. Deste modo, será importante que futuramente sejam organizadas ações de divulgação junto dos agentes que no seu quotidiano lidam com os animais, por forma a transmitir informações sobre práticas a evitar, já que estes nem sempre agem segundo as mais recentes evidências científicas.

Tanto quanto é do nosso conhecimento, ainda não foram estabelecidos valores de referência aplicáveis às explorações de ovinos existentes no Alentejo, no que diz respeito à definição e atribuição do estatuto clínico de cada exploração. Assim, este estudo deixou patente a necessidade de, num futuro próximo, serem definidos valores padrão que se ajustem à realidade alentejana. De facto, os critérios de classificação da doença que se encontram na bibliografia foram desenhados exclusivamente para uma realidade específica, não garantindo uma avaliação segura e credível quando transpostos para diferentes realidades, tal como ocorreu para a situação do Alentejo.

Cremos ter ficado também evidenciado que poderá constituir um equívoco se a atribuição de um dado estatuto para a doença for baseada em exclusivo numa única observação do efetivo. De facto, como foi reconhecido na nossa análise, a proporção de animais afetados poderá variar significativamente num espaço de tempo relativamente curto, mormente quando as condições climáticas se alterarem para valores que propiciem a transmissão da bactéria *D. nodosus*. Assim, será recomendável que em futuros estudos seja assegurada a possibilidade de os mesmos animais serem testados em períodos temporais intercalados, a fim de estabelecer o padrão evolutivo da doença.

Em suma, cremos que este trabalho pode revelar-se como um ponto de partida para a identificação de um grupo de animais que potencialmente exibem menor vulnerabilidade à peira. Acreditamos que será precisamente nos animais que não evidenciaram lesões de peira em qualquer das observações que poderá ser pertinente iniciar a pesquisa de marcadores genéticos potencialmente associados à resistência à doença. Assim, este trabalho constitui, em nossa opinião, um primeiro passo no sentido de ancorar o desenvolvimento de um programa específico de seleção de ovinos reprodutores no Alentejo, orientado para o reforço das características genéticas que melhoram a resistência face a esta afeição. Naturalmente, tal procedimento aumentaria a possibilidade de os ovinos reprodutores transmitirem determinados fatores de resistência aos seus descendentes. Acreditamos que, sendo criadas condições para pôr em prática um plano desta natureza, ocorreriam melhorias cruciais no que diz respeito aos índices de produtividade e à saúde financeira das explorações de ovinos da região.

## **Capítulo 6 – Relação entre os graus de severidade das lesões de peeira e a presença dos agentes *D. nodosus* e *F. necrophorum***

### **6.1 - Introdução**

A peeira é uma doença contagiosa de etiologia bacteriana que afeta essencialmente a espécie ovina (Bennett & Hickford, 2011). O agente *D. nodosus* é o verdadeiro agente etiológico da doença (Allworth, 2014), correspondendo a uma bactéria anaeróbia estrita, com coloração de Gram negativo (Raadsma & Egerton, 2013). Esta bactéria por norma só é encontrada nas úngulas de animais clinicamente afetados pela doença (Green & George, 2008), se bem que já tenham sido detetadas reduzidas concentrações bacterianas em membros clinicamente saudáveis (Witcomb *et al.*, 2014).

Outras bactérias também desempenham um papel importante na patogénese da doença, destacando-se a ação do agente *F. necrophorum* (Roberts & Egerton, 1969). Tal como acontece com *D. nodosus*, também esta bactéria é anaeróbia e Gram negativo (Nagaraja *et al.*, 2005). As principais diferenças entre os dois agentes residem na sua forma de distribuição, já que *F. necrophorum* é uma bactéria comensal do trato digestivo de ruminantes (Tan *et al.*, 1996; Nagaraja *et al.*, 2005) que também pode ser identificada na espécie humana (Riordan, 2007; Jayasimhan *et al.*, 2017). Os trabalhos de Bennett *et al.* (2009) também revelaram que o agente já foi detetado na cavidade oral de ovinos, resultante do modo de alimentação desta espécie. Uma vez que a bactéria é excretada nas fezes, é natural que este agente seja detetado no solo (Roberts & Egerton, 1969). Por consequência, a bactéria tem a oportunidade de colonizar as extremidades distais dos membros que contactam com um ambiente infetado pelo agente, pelo que é possível detetar o *F. necrophorum* tanto em úngulas saudáveis, como naquelas que se encontram afetadas por peeira (Atia *et al.*, 2017).

Apesar de ser consensual o reconhecimento de uma relação sinérgica entre os dois agentes na patogénese da doença (Bennett *et al.*, 2009), a função de *F. necrophorum* não está totalmente esclarecida. Uma das hipóteses adiantada refere que esta bactéria desempenha um papel de precursor da doença (Roberts & Egerton, 1969), já que tem a capacidade de provocar uma lesão de dermatite digital que poderá funcionar como canal de entrada para o verdadeiro agente etiológico (Raadsma & Egerton, 2013). Alternativamente, alguns autores têm desenvolvido pesquisas que apontam no sentido de que *F. necrophorum* corresponde a um agente oportunista (Clifton & Green, 2016), já que apenas são detetadas elevadas concentrações desta bactéria nas lesões mais severas de peeira (Atia *et al.*, 2017).

O diagnóstico de peera é essencialmente clínico, sendo alcançado através da observação das lesões características nos membros dos ovinos (Kaler & Green, 2008). Ainda assim, para confirmar a presença do agente etiológico desta afeção, é necessário recorrer a provas laboratoriais, tais como a observação de esfregaços com a coloração de Gram, a cultura microbiológica ou o PCR (Raadsma & Egerton, 2013; Frosth, 2016). A cultura já foi considerada a técnica mais eficaz no diagnóstico desta bactéria, no entanto o crescimento do agente em meio laboratorial é bastante longo e fastidioso. Também o facto de corresponder a um microrganismo anaeróbio acarreta algumas dificuldades no seu isolamento (Thorley, 1976; Pitman *et al.*, 1994). Assim, o surgimento de técnicas de diagnóstico molecular, como o PCR, que não obrigam à realização prévia da cultura do agente, constituiu um significativo progresso para o diagnóstico da doença, tendo sido descrita pela primeira vez por La Fontaine *et al.* (1993). Posteriormente, esta técnica foi sendo adaptada e melhorada por forma a ajustar-se às limitações que foram sendo detetadas, sendo que atualmente a técnica PCR em tempo real já fornece resultados bastante fidedignos e num reduzido período temporal (Frosth *et al.*, 2012).

As estirpes de *D. nodosus* podem ser diferenciadas de acordo com o respetivo grau de virulência, sendo vulgarmente classificadas como benignas ou virulentas. A distinção entre ambas faz-se pela presença ou ausência de determinados fatores de virulência específicos, como é o caso das proteases, das proteínas da membrana externa ou das fímbrias (Kennan *et al.*, 2001; Bennett & Hickford, 2011). No início dos processos de classificação, de acordo com o grau de virulência, utilizavam-se testes fenotípicos, como é o caso dos testes da elastase ou da gelatina em gel. O primeiro realiza cálculos sobre a atividade proteolítica das proteases, enquanto o segundo avalia a termoestabilidade de cada estirpe (Stewart, 1979; Liu & Young, 1993).

Mais recentemente, a determinação da virulência das bactérias começou a ser feita a partir de técnicas derivadas do PCR, as quais estão associadas a maiores índices de sensibilidade e de especificidade (Frosth *et al.*, 2012). Os referidos testes de diagnóstico têm a capacidade de detetar determinados segmentos do genoma, que podem estar associados a estirpes virulentas ou benignas. Dois desses genes são o *aprB2* e o *aprV2*, sendo que diferem somente nos dois pares de bases presentes na posição 661/662 (CG/TA) (Stäuble *et al.*, 2014). Esta diferença é suficiente para substituir o aminoácido que é inserido na posição 92 da proteína madura, sendo que o gene *aprV2* inclui o aminoácido tirosina, enquanto o *aprB2* contém a arginina na posição correspondente (Kennan *et al.*, 2010). Em termos práticos, esta modificação provoca alterações na capacidade elastolítica de cada estirpe (Kennan *et al.*, 2010; Stäuble *et al.*, 2014b). Ainda assim, os trabalhos de McPherson *et al.* (2017) detetaram o gene *aprV2* em algumas estirpes de *D. nodosus* que clinicamente não exibiram capacidade elastolítica, não tendo por isso apresentado capacidade para induzir lesões severas. Deste modo, ainda persistem dúvidas quanto à real validade da deteção destes genes como indicadores da virulência da bactéria *D. nodosus*.

A determinação do serogrupo de cada estirpe de *D. nodosus* representa outra das classificações frequentemente utilizada, a qual está diretamente relacionada com a capacidade imunogénica das fímbrias de cada bactéria (Claxton *et al.*, 1983), sendo assim associada de forma estreita com a vacinação para a peeira (Dhungyel *et al.*, 2014). Até à data são conhecidos 10 diferentes serogrupos (Chetwin *et al.*, 1991), que por sua vez se subdividem em 21 serotipos (Bhat *et al.*, 2012). Bhat *et al.* (2013) reportou ainda a possível existência de um novo serotipo (G3), contudo esse estatuto ainda foi oficialmente validado pela comunidade científica.

A distinção entre serogrupos é feita através das diferenças detetadas nas fímbrias de cada estirpe. Em termos práticos, essas diferenças devem-se às variações na região do terminal carboxilo do gene *fimA* (Dhungyel *et al.*, 2002), que codifica a subunidade tipo IV de cada fímbria (Kennan *et al.*, 2001). De acordo com a proximidade genética de cada uma dessas regiões do genoma, os serogrupos podem ser agregados em dois grupos distintos, sendo que a classe I engloba os serogrupos A, B, C, E, F, G, I e M, enquanto a classe II envolve os serogrupos D e H (Ghimire *et al.*, 1998).

Tanto quanto é do nosso conhecimento, até ao início do projeto GEN-RES-ALENTEJO ainda não tinham sido publicados quaisquer estudos que tivessem utilizado técnicas de diagnóstico molecular na deteção dos agentes envolvidos na patogénese da peeira na região Alentejo. Assim, o referido projeto deu origem a um ensaio pioneiro, cujos resultados foram publicados por Albuquerque (2019). Assim, o objetivo primordial do trabalho desenvolvido neste capítulo foi relacionar os resultados de deteção dos agentes *D. nodosus* e *F. necrophorum*, obtidos no trabalho da autora, com os graus lesionais que foram atribuídos aos membros nos quais foram recolhidas amostras biológicas nas visitas às 17 explorações. Para o agente etiológico da peeira, o ensaio descrito por Albuquerque (2019) também caracterizou as diferentes estirpes isoladas quanto à virulência e ao serogrupo.

## **6.2 – Metodologia**

### **6.2.1 – Recolha de amostras nas úngulas dos ovinos**

As amostras que tiveram por base a origem deste trabalho foram recolhidas nas segundas visitas realizadas a cada uma das 17 explorações tratadas no Capítulo 5 deste trabalho. As recolhas dessas amostras foram efetuadas através da técnica de biópsia cutânea nas extremidades distais dos membros de alguns dos animais em que se procedeu à classificação de lesões de peeira segundo a escala de cinco níveis desenvolvida por Egerton & Roberts (1971). Na aplicação deste procedimento foi utilizado um *punch* de biópsia estéril e descartável com 6 mm de diâmetro (Figura 6.1), tal como descrito por Witcomb *et al.* (2015). Com o propósito de eliminar eventuais

contaminantes existentes naquela superfície cutânea, foi realizada previamente uma lavagem da extremidade distal com água aplicada por pulverização, procedendo-se de seguida à assepsia com recurso a uma solução de clorhexidina (10 mg/mL). O procedimento de biópsia foi efetuado sob ação do anestésico local lidocaína (Anestésin®). As recolhas foram realizadas nas margens das lesões ou, no caso dos animais que não apresentavam qualquer lesão podal, na área central do espaço interdigital. O material biológico recolhido foi colocado em tubos *Eppendorf*, sendo de imediato armazenado num contentor com azoto líquido (Figura 6.2).



Figura 6.1 – Procedimento de biópsia cutânea  
(Fotografia de Ricardo Romão)



Figura 6.2 – Armazenamento das amostras em  
contentor de azoto líquido (Fotografia de Ricardo  
Romão)

Cada tubo encontrava-se devidamente identificado com a marca auricular (SIA) do animal, a referência ao membro alvo, a data em que decorreu a recolha e a identificação correspondente a cada exploração.

Creemos ser relevante mencionar que a seleção dos animais e dos membros em que se realizaram as biópsias não decorreu de forma aleatória. Na realidade, como o objetivo principal do trabalho era caracterizar a população microbiana presente nos dígito de membros com diferentes *scores* lesionais de peeira, a decisão de seleção teve em conta este propósito. Assim, procurámos que as biópsias assegurassem a representatividade dos diferentes graus de severidade lesional identificados na exploração, considerando apenas os *scores* que foram registados nas segundas visitas. Deste modo, as unidades em que foi possível observar várias lesões classificadas em todos os graus da escala foram aquelas em que, tendencialmente, foi recolhido um maior volume de amostras. Ao invés, nos efetivos em que a maioria dos animais exibiu extremidades distais com *score* 0 foram recolhidas menos amostras.

Por questões éticas, e uma vez que a biópsia é uma técnica invasiva (Frosth, 2016), o número de amostras recolhidas foi relativamente reduzido, comparativamente com o total de animais avaliados. Importa, ainda assim, ressaltar que em todos os animais submetidos a esta intervenção, foi administrado o antibiótico oxitetraciclina (Oxymycin® LA) e o anti-inflamatório não esteroide carprofeno (Rimadyl®) por via sistémica.

Adicionalmente, ainda se aplicou o mesmo antibiótico por via tópica (Terramicina® Nebulizador) no local de colheita. Estes procedimentos foram postos em prática por forma a assegurar condições que garantissem que o bem-estar animal não fosse posto em causa.

### 6.2.2 – Processamento laboratorial das amostras recolhidas

Tal como referido, o processamento laboratorial das amostras recolhidas ficou a cargo de outras entidades parceiras no projeto GEN-RES-ALENTEJO, nomeadamente o INIAV e o CEBAL. As especificidades de cada uma das técnicas bacteriológicas e moleculares que foram executadas encontram-se discriminadas no trabalho de Albuquerque (2019). De forma bastante sintética, as principais tarefas realizadas em contexto laboratorial nas referidas instituições foram as seguintes:

- Detecção dos agentes *D. nodosus* (PCR em tempo real e cultura bacteriana) e *F. necrophorum* (PCR em tempo real) nas amostras recolhidas;
- Uso do PCR em tempo real para diferenciar a virulência das estirpes de *D. nodosus*;
- Aplicação do PCR *multiplex* para determinar os serogrupos de *D. nodosus* presentes.

### 6.2.3 – Análise estatística dos dados obtidos

Os dados obtidos nestas análises foram registados e avaliados através dos programas *IBM SPSS Statistics (version 26)* e *Gretl (version 1.1)*. As interpretações realizadas para as diferentes variáveis foram obtidas através dos parâmetros de estatística descritiva, tendo as comparações entre dois grupos sido executadas através do cálculo do OR, bem como do respetivo IC. Os níveis de significância considerados para os testes estatísticos foram 95, 99 e 99,9%.

Analisou-se ainda a existência de algum tipo de correlação entre a deteção dos agentes bacterianos e os *scores* médios das lesões que foram utilizadas para a sua identificação. A referida análise foi feita através da construção de um modelo de regressão linear, tendo sido utilizado o método dos mínimos quadrados.

## 6.3 – Resultados

Foram analisadas um total de 261 amostras recolhidas ao longo das segundas visitas às 17 explorações, sendo que 154 delas foram recolhidas no ano de 2017, enquanto as

restantes 107 foram obtidas no ano seguinte. Os resultados globais demonstram que a deteção dos agentes *D. nodosus* e *F. necrophorum* se cifraram nos 50,96 e 46,74%, respetivamente.

### 6.3.1 – Análise de acordo com a classificação lesional

A deteção do agente *D. nodosus* não foi homogénea para os cinco níveis da escala utilizada para a categorizar as lesões de peeira (Egerton & Roberts, 1971), tal como se pode constatar através da observação do Gráfico 6.1. De facto, é possível verificar que existe uma propensão para as amostras referentes aos *scores* de peeira mais elevados terem revelado uma maior frequência de resultados positivos. O *score* 0 revelou uma taxa de identificação do agente bastante reduzida (apenas 3,6%), sendo que o patamar seguinte já apresenta um valor consideravelmente maior (43,8%). No caso dos três patamares superiores, os valores respetivos são similares entre eles, sendo substancialmente mais elevados que os graus de severidade mais baixos (variação entre 81,6 e 86,4%).

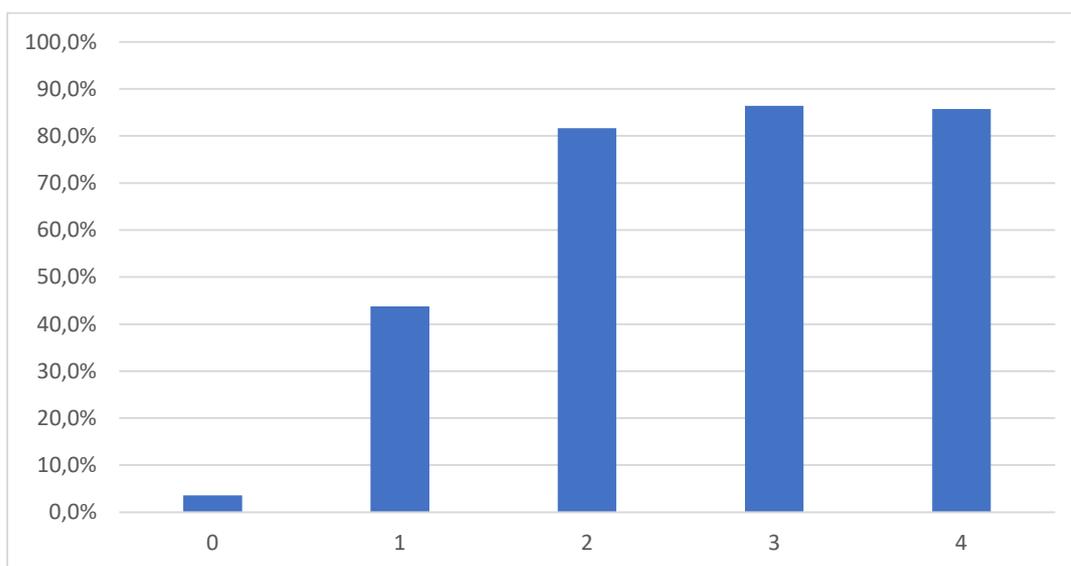


Gráfico 6.1 – Percentagem de amostras em que se detetou *D. nodosus*, de acordo com o score de peeira

Pelo critério utilizado por Abbott (2000), em que apenas as lesões com uma classificação superior ou igual a 2 são efetivamente consideradas como características de peeira, verificamos que estas lesões registam uma possibilidade de deteção de *D. nodosus* 24,5 vezes superior comparativamente com as amostras recolhidas em membros com *score* 0 ou 1 (OR=24,525; IC 95% [12,8; 47]; valor  $p < 0,001$ ).

No processo de avaliação da presença de *F. necrophorum*, também se constatou a existência de uma probabilidade crescente de identificar o referido agente pelas técnicas laboratoriais, à medida que os *scores* de peeira se revelaram mais severos. Para este agente registámos mesmo um incremento relativamente constante entre todos os patamares, algo que não se verificou para a bactéria *D. nodosus*. Assim, as frequências extremas registaram-se para os graus 0 (23,8%) e 4 (85,7%) (Gráfico 6.2).

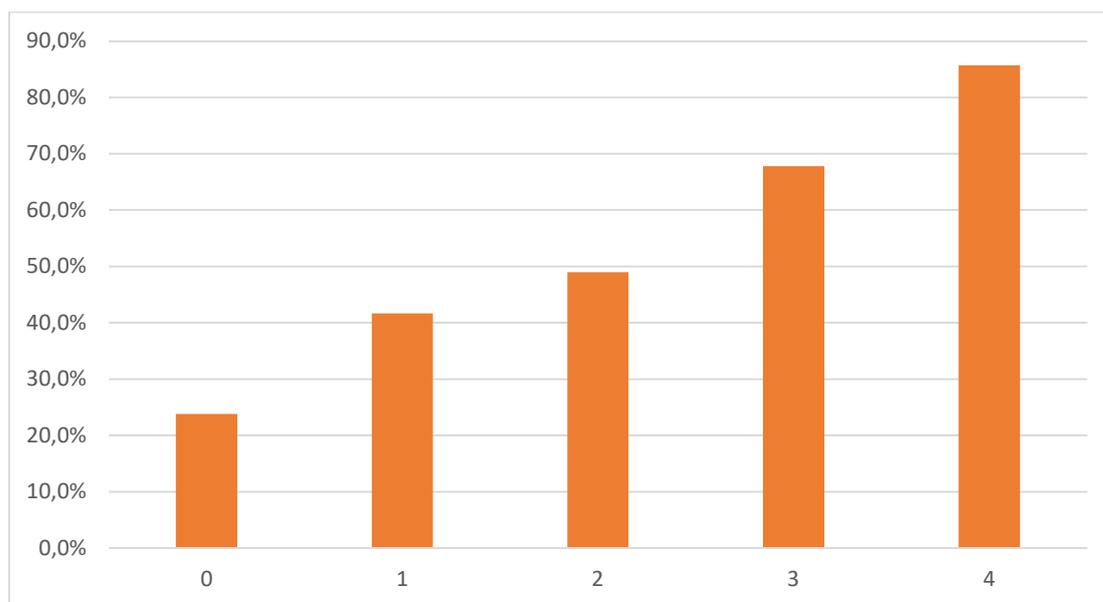


Gráfico 6.2 – Percentagem de amostras em que se detetou *F. necrophorum*, de acordo com o score de peeira

A comparação entre as lesões que macroscopicamente são classificadas como características de peeira e aquelas que têm um *score* menor ou igual a 1, revela que as primeiras apresentam uma possibilidade de ser identificado o agente *F. necrophorum* que foi o quádruplo da verificada naquelas que não têm lesões de peeira (OR=4,0128; IC 95% [2,4; 6,72]; valor  $p < 0,001$ ). Ainda assim, nota-se que esta diferença é muito menos vincada do que a exibida por *D. nodosus*.

A comparação direta entre as frequências de identificação dos dois agentes revela que a deteção de *F. necrophorum* superou largamente a relativa a *D. nodosus*, se considerarmos apenas as amostras com o *score* mais reduzido. No grau seguinte, as frequências dos dois agentes são equivalentes, enquanto nos graus 2 e 3 foi a bactéria *D. nodosus* a mais frequentemente identificada. Por fim, as lesões mais severas de peeira revelaram exatamente a mesma percentagem de isolamento para os dois agentes (85,7%) (Gráficos 6.1 e 6.2).

Para avaliar com maior profundidade qual a importância relativa de cada uma das bactérias, tanto de forma independente como através da presença combinada dos dois agentes, contruímos o Gráfico 6.3. O mesmo contempla, para cada *score* lesional, a

percentagem de amostras em que se isolou cada um dos agentes, de forma separada ou em conjunto, ou em que não foi detetado qualquer desses agentes.

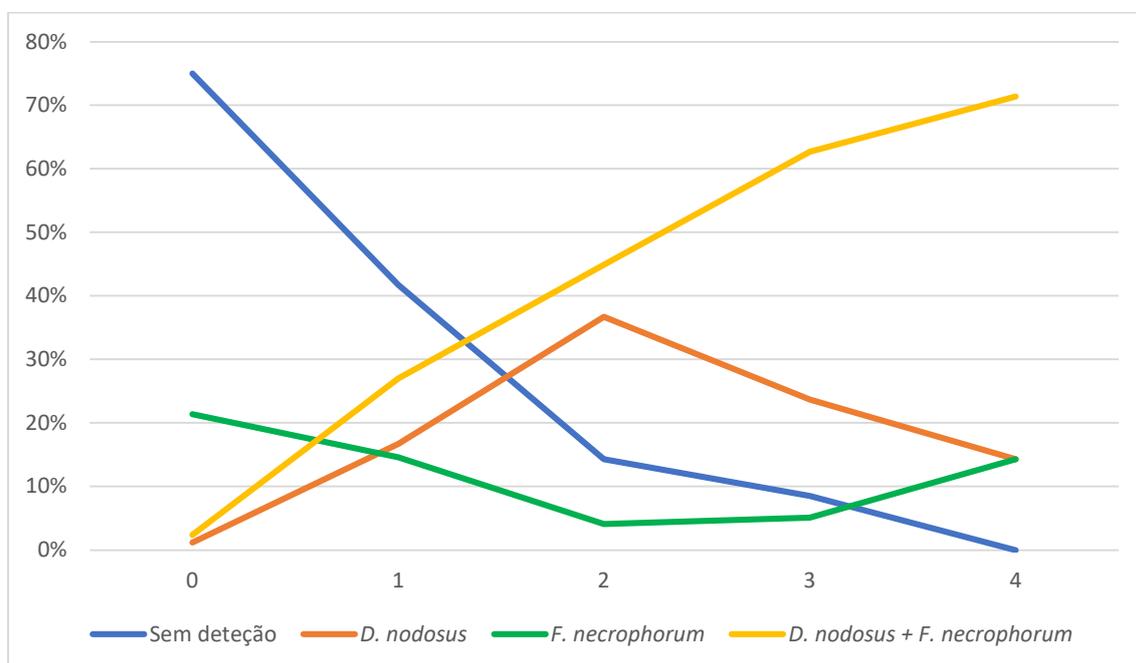


Gráfico 6.3 – Distribuição percentual das diferentes combinações dos resultados (deteção, ou ausência de deteção, de *D. nodosus* e/ou *F. necrophorum*), de acordo com o score lesional

Da visualização do Gráfico 6.3 retiramos de forma inequívoca que a percentagem de amostras em que não se detetou qualquer dos agentes foi gradualmente decrescente desde o grau 0 (75%) até ao grau 4 (0%). No caso da identificação simultânea dos dois agentes, a situação foi sensivelmente a inversa, já que no patamar inicial foi registado um índice reduzido (2,4%), verificando-se incrementos sucessivos entre os diferentes graus, situando-se o valor mais elevado na forma clínica mais severa da doença (71,4%). A situação da deteção exclusiva do agente *F. necrophorum* revela que o valor mais elevado se registou nas biópsias referentes ao *score* 0 (21,4%), sendo que os restantes graus apresentaram valores mais reduzidos, não tendo ainda assim sido registada nenhuma tendência dominante. Por fim, a identificação isolada da bactéria *D. nodosus* mostrou um valor reduzido no primeiro grau lesional (1,2%), aumentando gradualmente até ao índice mais elevado que foi registado para o *score* 2 (36,7%). Posteriormente, as duas classificações lesionais mais severas revelaram percentagens tendencialmente decrescentes.

De facto, verificamos que a possibilidade de uma análise em que tenham sido detetadas as duas bactérias ser proveniente de uma lesão considerada severa ultrapassou o dobro da exibida pelas amostras em que se identificou exclusivamente *D. nodosus* (OR=2,2321; IC 95% [12,8; 47]; valor  $p < 0,05$ ). Este dado torna-se particularmente interessante se

tivermos em consideração a observação do Gráfico 6.3, uma vez que os traçados referentes a estas duas variáveis assumem um comportamento idêntico nas três primeiras categorias, sendo que a partir desse ponto a tendência é claramente divergente. No caso da detecção isolada do verdadeiro agente etiológico da peeira, regista-se um decréscimo marcado nos graus lesionais 3 e 4, enquanto a linha referente à associação das duas bactérias manifesta o mesmo comportamento de subida que vinha a ser exibido nos scores menos severos.

### 6.3.2 – Análise dos resultados ao nível da exploração

A detecção dos dois agentes considerados no estudo não foi verificada em todas as explorações. No caso de *D. nodosus*, em quatro explorações (A, D, F e P) não foi possível detetar a presença do agente através das análises laboratoriais executadas por Albuquerque (2019). No caso do agente *F. necrophorum*, em 16 efetivos foi possível verificar a sua presença nas amostras recolhidas, sendo a exploração A a única em que tal não foi possível. Refira-se que este efetivo foi aquele em que um menor número de amostras foi recolhido (n=4), algo que poderá justificar a ausência de qualquer resultado positivo.

Avaliando as explorações em que se obteve uma maior taxa de detecção da bactéria *D. nodosus*, aquelas que mais se destacaram foram a O (90%), H (83,3%) e E (72,4%). No caso de *F. necrophorum*, aquelas que revelaram uma maior percentagem de resultados positivos foram a O (100%), E (72,4%), L (69,2%) e J (68,4%). As Tabelas 6.1 e 6.2, referentes aos anos 2017 e 2018 respetivamente, apresentam os resultados de detecção dos dois agentes, bem como a classificação lesional dos membros em que foi feita a recolha de amostras em cada exploração.

Tabela 6.1 – Detecção de *D. nodosus* e *F. necrophorum* nas explorações avaliadas em 2017, considerando os scores das amostras

Exp.	Amostras (n)	Classificação lesional						<i>D. nodosus</i>		<i>F. necrophorum</i>	
		0	1	2	3	4	$\mu$	Pos.	%	Pos.	%
A	4	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	11	5	4	2	0	0	0,7	3	27,3	1	9,1
C	21	8	2	3	7	1	1,6	9	42,9	11	52,4
D	14	13	1	0	0	0	0,1	0	0	1	7,1
E	29	6	7	7	8	1	1,7	21	72,4	21	72,4
F	6	5	1	0	0	0	0,2	0	0	1	16,7
G	15	4	3	4	4	0	1,5	8	53,3	5	33,3
H	24	4	4	5	10	1	2	20	83,3	12	50
I	11	3	2	3	3	0	1,5	6	54,6	3	27,3
J	19	3	4	6	3	3	2	10	52,6	13	68,4
<b>Total</b>	<b>154</b>	<b>55</b>	<b>28</b>	<b>30</b>	<b>35</b>	<b>6</b>	<b>1,4</b>	<b>77</b>	<b>50,7</b>	<b>68</b>	<b>44,2</b>

Tabela 6.2 – Detecção de *D. nodosus* e *F. necrophorum* nas explorações avaliadas em 2018, considerando os scores das amostras

Exp.	Amostras (n)	Classificação lesional						<i>D. nodosus</i>		<i>F. necrophorum</i>	
		0	1	2	3	4	$\mu$	Pos.	%	Pos.	%
K	9	5	1	1	1	1	1,1	3	33,3	3	33,3
L	26	5	6	5	6	4	1,5	17	65,4	18	69,2
M	18	4	3	4	5	2	1,9	12	66,7	6	33,3
N	20	3	5	4	4	4	2,1	12	60	8	40
O	10	2	0	2	5	1	2,3	9	90	10	100
P	7	5	1	1	0	0	0,4	0	0	4	57,1
Q	17	5	4	2	3	3	1,7	3	17,6	5	29,4
<b>Total</b>	<b>107</b>	<b>29</b>	<b>20</b>	<b>19</b>	<b>24</b>	<b>15</b>	<b>1,3</b>	<b>56</b>	<b>52,3</b>	<b>54</b>	<b>50,5</b>

A análise combinada dos *scores* médios obtidos nos membros utilizados para a colheita de amostras, em conjunto com a percentagem de identificação da bactéria *D. nodosus*, demonstra que os quatro efetivos de ovinos em que não se obteve qualquer resultado positivo foram aqueles que apresentaram um *score* médio mais reduzido (< 0,5). No extremo oposto, as seis explorações em que se detetou a presença do agente em mais de 60% das amostras apresentaram todas um grau médio das lesões elevado (> 1,5). Esta evidência parece deixar bem clara a existência de uma associação positiva entre os dois fatores analisados.

Para comprovar essa tendência, realizámos uma análise de regressão linear entre o valor médio dos graus lesionais atribuídos aos membros dos ovinos que foram considerados em cada exploração e as percentagens de deteção dos dois agentes bacterianos nessas mesmas amostras (Tabela 6.3).

Tabela 6.3 – Análise de regressão linear entre o *score* médio das amostras recolhidas em cada exploração e a deteção dos agentes *D. nodosus* e *F. necrophorum* (%; n=17)

Variável dependente: <i>Score</i> médio das lesões	Coefficiente	Erro padrão	Valor p
<i>D. nodosus</i>	0,429422	0,384672	< 0,001
<i>F. necrophorum</i>	2,00702	0,437157	0,3426
Constante	0,306989	0,158605	0,0734
R <sup>2</sup> = 0,827853		R <sup>2</sup> ajustado = 0,80326	
Critério Akaike = 14,07964		Critério Schwarz = 16,57928	

Esta análise demonstrou que, quando consideradas as duas bactérias em simultâneo, a presença de *D. nodosus* é a que apresenta uma correlação estatisticamente significativa com o *score* médio das lesões de cada exploração, visto que foi a variável que exibiu um valor p significativo (< 0,001). O facto de o coeficiente da variável apresentar um sinal positivo determina que a correlação existente ocorra no sentido direto. No caso da variável relativa a *F. necrophorum*, esta não apresentou qualquer significância estatística, o que sugere que a presença deste agente não seja tão determinante para o *score* médio das lesões em cada exploração, quando são analisados os resultados das

duas bactérias conjuntamente. Para este resultado terá contribuído o facto de o número de deteções de *D. nodosus* nas biópsias provenientes de membros com grau 0 ser praticamente nulo, algo que não acontece para *F. necrophorum*, uma vez que mesmo no primeiro patamar da escala considerada quase ¼ das amostras revelou a presença deste agente.

### 6.3.3 – Análise da virulência das estirpes de *D. nodosus*

A utilização do PCR em tempo real também permite proceder à distinção entre estirpes de *D. nodosus* benignas e virulentas (Stäuble *et al.*, 2014a). Entre as 132 estirpes de *D. nodosus* em que o estudo de Albuquerque (2019) aplicou a referida técnica de diagnóstico, a vasta maioria (n=127) correspondeu a estirpes consideradas virulentas, devido à deteção do gene *aprV2*. As restantes cinco exibiram um resultado inconclusivo, não sendo possível incluí-las em qualquer categoria de virulência. Deste modo, os trabalhos daquela autora verificaram que o método de diagnóstico utilizado não detetou o gene *aprB2* em nenhuma amostra processada, o que pode indiciar que esta forma de caracterizar a virulência do agente pode não se revelar a mais adequada para as estirpes que foram detetadas em ovinos dos rebanhos existentes na região Alentejo.

### 6.3.4 – Análise dos serogrupos das estirpes de *D. nodosus*

A determinação dos serogrupos de *D. nodosus* foi realizada em 56 amostras em que foi detetada a presença de alguma estirpe desta bactéria, tendo as amostras sido selecionadas de forma aleatória entre as 130 provenientes de lesões de grau diferente de 0. A análise executada nos trabalhos de Albuquerque (2019) foi feita através da aplicação da técnica PCR *multiplex*, tal como indicado por Best *et al.* (2018). A referida técnica foi aplicada em dois tipos de amostras distintos. Num desses processos, os diferentes serogrupos foram testados diretamente a partir das estirpes de *D. nodosus* que foram isoladas através da cultura bacteriológica. A outra forma de diferenciação dos serogrupos baseou-se no DNA total extraído diretamente das respetivas biópsias. A análise combinada destes dois procedimentos determinou que tivesse sido possível concluir a identificação dos serogrupos em 29 casos, equivalente a 51,8% das estirpes submetidas para análise. A distribuição dos diferentes serogrupos encontra-se expressa no Gráfico 6.4, expondo de forma clara que o serogrupo B é aquele que evidencia uma maior proporção de identificação (65,5%).

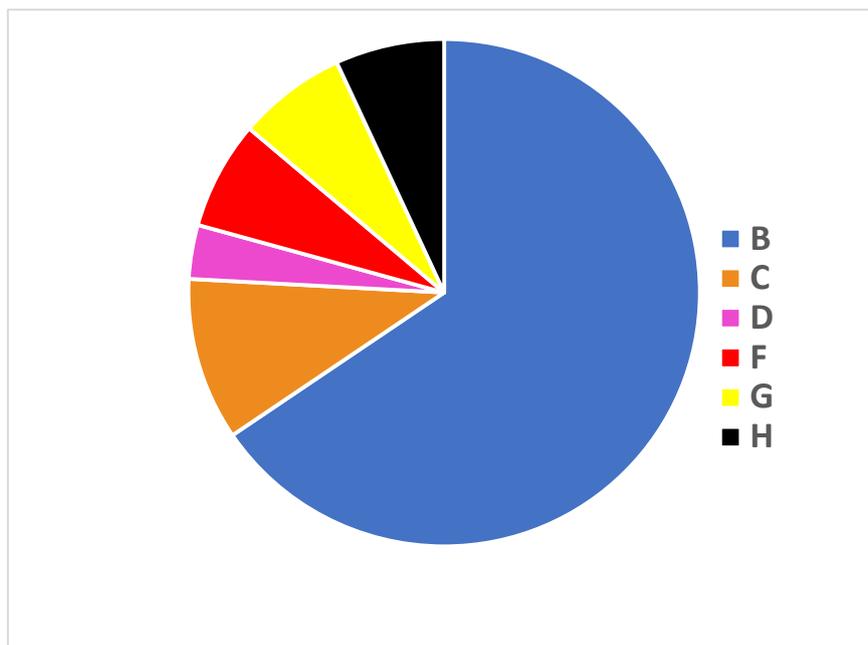


Gráfico 6.4 – Distribuição percentual dos diferentes serogrupos de *D. nodosus* (n=29)

Ao analisarmos os serogrupos que foram determinados nas amostras recolhidas em cada concelho, observamos que o serogrupo mais prevalente (B) foi detetado em sete dos oito concelhos em que foi possível diagnosticar os serogrupos presentes, sendo o concelho de Portalegre o único em que não foi detetada a sua presença (Figura 6.1). Se compararmos as quatro sub-regiões, constatamos que os serogrupos G e H foram identificados exclusivamente em concelhos do Alto Alentejo, enquanto as estirpes do grupo D só foram detetadas num concelho do Alentejo Central (Figura 6.3).

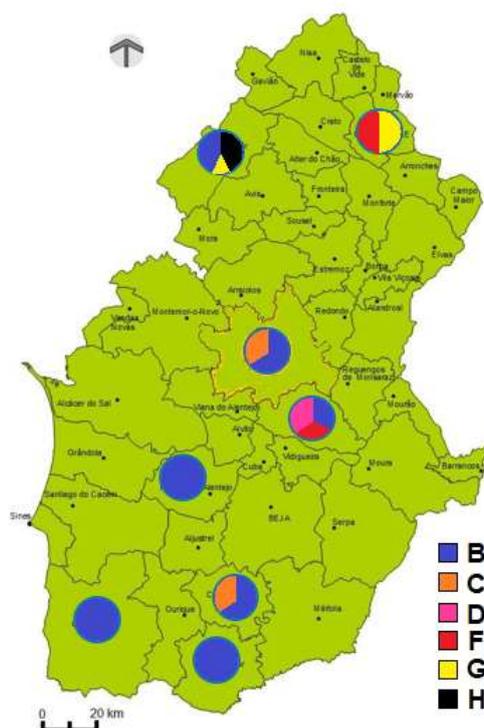


Figura 6.3 – Distribuição dos serogrupos identificados por concelho (n=29)

## 6.4 – Discussão

O estudo desenvolvido por Albuquerque (2019), que teve por base as amostras recolhidas no nosso trabalho, corresponde ao segundo estudo alguma vez realizado no Alentejo que teve o propósito de caracterizar a população microbiana envolvida na patogénese da peeira. O primeiro trabalho foi desenvolvido por Jiménez *et al.* (2003), tendo por base amostras recolhidas nos anos de 1997 e 1998, precisamente duas décadas antes da realização do presente estudo. Assim, será bastante provável que os resultados obtidos nos trabalhos de Jiménez *et al.* (2003) se encontrem desfasados da situação existente nos dias de hoje. Adicionalmente, temos de ter em consideração que a metodologia utilizada por estes autores incluía apenas técnicas bacteriológicas, como foi o caso da cultura microbiológica, apresentando, portanto, algumas desvantagens se for feita uma comparação direta com as técnicas de diagnóstico molecular (Frosth, 2016) que foram utilizadas no ensaio realizado por Albuquerque (2019). O estudo desenvolvido por Jiménez *et al.* (2003) também apresenta uma limitação óbvia em comparação com a presente investigação, uma vez que a população alvo foram 17 explorações dispersas pelo Alentejo, enquanto o primeiro trabalho só englobou quatro unidades pecuárias. Evidentemente que este facto sugere que o estudo concretizado em 2017 e 2018 contemplou uma amostra mais representativa da população de ovinos existentes no Alentejo.

A escolha do método de recolha das amostras recaiu na utilização da técnica de biópsia cutânea. Alternativamente, poder-se-ia ter procedido à recolha de amostras através da utilização de zaragatoas do espaço interdigital, tal como foi utilizado nos trabalhos de Witcomb *et al.* (2014) ou de Frosth *et al.* (2015). Este método, para além de não ser invasivo, não provoca lesões nos tecidos, o que se torna fulcral para a não alteração do curso normal da doença, aspeto fundamental na implementação de um estudo longitudinal (Witcomb *et al.*, 2014). Adicionalmente, as amostras com zaragatoa têm a capacidade de recolher bactérias em toda a extensão do espaço interdigital, enquanto a biópsia fica limitada à área da sua circunferência (Witcomb *et al.*, 2015). Ainda assim, a técnica da biópsia foi a eleita uma vez que esta tem a capacidade de detetar agentes bacterianos que permaneçam em maior profundidade, enquanto as zaragatoas só têm a capacidade de recolher bactérias superficiais (Witcomb *et al.*, 2015; Frosth, 2016). Outro dos motivos que nos levou a optar pela recolha de amostras através da biópsia cutânea prendeu-se com um dos principais objetivos do projeto GEN-RES-ALENTEJO, que pretendia caracterizar o agente etiológico da peeira através de uma análise metagenómica, sendo que os estudos que já empregaram esta abordagem genómica recolheram as amostras a partir de biópsia digital (Calvo-Bado *et al.*, 2011; Maboni *et al.*, 2017). O trabalho de McPherson *et al.* (2019) analisou o microbioma dos agentes presentes em lesões de peeira, tendo para isso recolhido amostras através do uso de zaragatoas. Contudo, tal publicação não se encontrava disponível no momento em que

se deu início ao Projeto, pelo que não foi possível seguir a metodologia descrita pelos referidos autores.

A configuração como o presente estudo foi concebido não permite calcular de forma exata a prevalência destes agentes bacterianos em cada exploração, uma vez que a seleção dos animais e dos respetivos membros a incluir na amostra não foi totalmente aleatória, sendo assumido que esse não era o principal objetivo do ensaio. Este estudo pretendeu precisamente dar ênfase à pesquisa de algum tipo de relação entre a deteção de agentes microbianos e as observações macroscópicas das lesões de peira. Assim, o propósito fundamental da seleção dos animais a serem incluídos na amostragem foi que, em cada exploração, os membros dos ovinos escolhidos para a realização de biópsias cobrissem os diferentes *scores* lesionais que foram identificados em cada um dos efetivos pecuários incluídos no estudo. Assim, no processo de seleção definimos uma amostra de conveniência ajustada ao objetivo do estudo, não sendo necessariamente representativa da totalidade do efetivo.

Caso tivéssemos recorrido a uma amostra totalmente aleatória corríamos o risco de a maioria dos membros selecionados corresponder a classificações de *score* 0, já que, tal como exposto no Capítulo 5, este correspondeu ao grau lesional mais abundante, equivalente a 84,7% do total dos 13572 membros avaliados. Deste modo, e como o número de animais em que foram colhidas amostras em cada exploração foi relativamente reduzido, devido a questões éticas relacionadas com a técnica da biópsia, poderíamos estar a proporcionar uma situação em que para a maioria do material colhido não fosse possível detetar os agentes envolvidos na patogénese da doença. Caso essa situação sucedesse não conseguiríamos concretizar um dos objetivos centrais do estudo, que consiste na caracterização dos principais agentes bacterianos presentes nas lesões de peira.

Apesar da limitação referida, que não possibilita o cálculo da prevalência dos agentes em cada exploração, consideramos que a análise combinada entre os valores médios dos graus de peira e a percentagem de deteção do *D. nodosus* nessas amostras, tem a capacidade de indiciar o estatuto clínico desta doença em cada exploração. Se analisarmos de forma detalhada os resultados obtidos nas quatro explorações em que não foi detetada a presença de qualquer estirpe de *D. nodosus* (A, D, F e P), verificamos que são estas as explorações que tiveram um *score* médio mais reduzido nos membros selecionados para amostragem. Três dessas explorações são as que, no trabalho desenvolvido no Capítulo 5, foram categorizadas com o estatuto clínico menos severo, o que revela uma boa concordância entre a classificação atribuída pelas duas análises. A única exceção verifica-se na exploração P, uma vez que não tinha sido atribuída a categoria mais reduzida em termos de expressão da doença, apesar de não ter sido possível detetar a presença do agente. Todavia, esta situação poderá ser justificada pelo facto de o momento em que foram recolhidas as biópsias interdigitais ter correspondido àquele em que havia menos hipóteses de identificar *D. nodosus*. De facto, a segunda

visita a esta exploração foi a que revelou menos animais com lesões de peeira (apenas um ovino apresentou uma lesão de grau 2, entre os 96 animais avaliados). Na primeira visita a essa exploração observaram-se resultados mais expressivos em termos de severidade da doença, já que 7,4% dos ovinos considerados exibiram lesões de peeira e 1,8% apresentaram lesões consideradas severas. Esta diferença marcada entre as duas monitorizações do efetivo deveu-se, presumivelmente, às desigualdades verificadas na componente ambiental, mormente na pluviosidade registada. Enquanto nas seis semanas que antecederam a primeira visita o valor de precipitação se cifrou em 175 mm/m<sup>2</sup>, em igual período para a segunda visita o índice pluviométrico correspondente reduziu de forma drástica, situando-se nos 35,9 mm/m<sup>2</sup>. Assim, seria expectável que se a recolha de amostras tivesse decorrido em condições ambientais mais favoráveis para a bactéria, teria sido possível identificar o agente etiológico da peeira, o que justifica o desfazamento entre o resultado aqui obtido e aquele que havia sido apresentado no capítulo anterior.

Focando agora as explorações que exibiram índices de deteção do *D. nodosus* superiores, podemos admitir que os três núcleos pecuários que, de acordo com as amostras recolhidas, exibem uma situação sanitária mais severa para a doença foram as explorações E, H e O. Se compararmos de forma direta estes resultados com os obtidos no Capítulo 5, verificamos que este não é o grupo de explorações que aí foi identificado como aquele que apresentou um estatuto clínico mais severo. Esta aparente incongruência será, ainda assim, explicada por dois motivos principais. O primeiro, deve-se precisamente ao facto de a seleção dos membros dos animais em que se recolheram as amostras não ter decorrido de forma aleatória, o que automaticamente inflacionou o *score* médio das lesões nas explorações que tinham menos animais afetados pela doença. O segundo motivo está relacionado com o facto de as conclusões obtidas no Capítulo 5 resultarem da interpretação conjunta das duas visitas a cada exploração, enquanto os resultados aqui apresentados considerarem apenas a segunda visita. Tal como já havia sido adiantado, a atribuição de um estatuto clínico para cada efetivo não deverá ser feita com base exclusiva numa única observação dos animais, uma vez que a aplicação de tratamentos prévios ou a presença de efeitos ambientais inibidores poderão ser responsáveis pela obtenção de resultados que não correspondam à real severidade da doença (Raadsma & Egerton, 2013). Em termos de conclusão, consideramos que os resultados apresentados no Capítulo 5, que resultam da observação de uma amostra aleatória de animais pertencentes a cada rebanho, têm maior relevância para efetuar uma comparação válida entre explorações, no que respeita à severidade da doença.

O procedimento desenvolvido por Albuquerque (2019) permitiu identificar o agente *F. necrophorum* em 16 das 17 explorações incluídas no ensaio, sendo a unidade B a única em que não foi detetada a bactéria. Recordemos, como já havia sido referido, que os ovinos incluídos nas explorações A e B são coabitantes nas mesmas áreas. Assim, o facto

de as amostras recolhidas no rebanho A terem revelado a presença de *F. necrophorum*, enquanto as amostras do efetivo B não detetaram a presença desse agente, expõe uma aparente inconsistência. Porém, esta situação pode ser justificável pela reduzida amostragem considerada no rebanho B, em que só foram analisados quatro fragmentos cutâneos, correspondendo ao menor volume de amostras colhidas entre as 17 explorações. Uma vez que os ovinos dos rebanhos A e B pastoreiam nas mesmas áreas, a população microbiana presente nos dois rebanhos será tendencialmente idêntica. Esta constatação parece lógica, já que estamos a referir-nos a uma bactéria telúrica (Roberts & Egerton, 1969), logo todos os ovinos nesses efetivos apresentam uma probabilidade similar de terem os seus dígitos colonizados pelo agente.

Parece assim seguro assumir que a bactéria *F. necrophorum* está presente nos espaços interdigitais de ovinos em todas as explorações que foram incluídas no estudo. Este resultado ocorre de acordo com o esperado, já que estamos a referir-nos a uma bactéria que faz parte da flora normal que se encontra no trato digestivo dos ovinos (Nagaraja *et al.*, 2005), pelo que será recorrentemente excretada nas fezes, daí que seja frequentemente encontrada no solo (Roberts & Egerton, 1969). Em consequência deste facto, o agente consegue facilmente colonizar as úngulas dos ovinos quando estes pisoteiam áreas conspurcadas com fezes. Assim, não será de estranhar que esta bactéria possa ser detetada em membros que não exibam lesões de peeira, tal como foi possível constatar em 24% das amostras provenientes de membros classificados no patamar menos severo (grau 0).

A análise integrada entre a classificação lesional atribuída e a deteção dos agentes *D. nodosus* e *F. necrophorum* revelou que ambas as bactérias exibiram frequências tendencialmente crescentes com o agravar das lesões de peeira. Este resultado era expectável, uma vez que os dois agentes estão interligados no que diz respeito à apresentação clínica da peeira em ovinos sujeitos a um maneio predominantemente extensivo (Bennett *et al.*, 2009). Ainda assim, a proporção relativa de amostras em que se obteve um resultado positivo nos vários patamares da doença não foi idêntica para as duas bactérias, tal como se constata nos Gráficos 6.1 e 6.2.

No caso da bactéria *D. nodosus*, verificou-se que o *score* 0 exibiu uma percentagem de deteção do agente pouco significativa, tendo o valor aumentado de forma acentuada nos dois níveis seguintes. No grau 2 registou-se então uma percentagem de deteção na ordem dos 82%, valor que se manteve praticamente inalterado nos *scores* 3 e 4. A situação de *F. necrophorum* exhibe um comportamento crescente e linear, já que no patamar inicial o nível de deteção foi de cerca de 24%, tendo esse valor aumentado gradualmente para os *scores* superiores, atingindo o valor máximo no grau mais severo (86% de deteção no *score* 4).

A diferença entre os dois agentes também fica patente quando calculamos os valores de OR relativos à comparação entre as amostras provenientes de lesões de peeira (*score*

$\geq 2$ ) e as restantes. Para a bactéria *D. nodosus*, constatou-se que a probabilidade de detecção desse agente é quase 25 vezes superior nas amostras provenientes de lesões de peeira, enquanto para *F. necrophorum* o OR ronda o valor 4. Apesar de ambos os valores terem apresentado significância estatística (valor  $p < 0,001$ ), a disparidade verificada entre os dois deixa bem patente que a presença de *D. nodosus* é aquela que mais se relaciona com ocorrência de lesões características desta afeição, no caso de se avaliarem os dois agentes de forma independente.

Para mais facilmente compreender o efeito da presença dos dois agentes, quando são detetados de forma isolada ou em caso de associação entre ambos, importa analisar de forma atenta o Gráfico 6.3. Se nos focarmos exclusivamente nas linhas referentes à bactéria *D. nodosus* e à combinação dos agentes *D. nodosus* e *F. necrophorum*, verificamos que os valores apresentados para os *scores* 0, 1 e 2 são bastante similares, evidenciando uma trajetória evolutiva crescente. Contudo, a partir deste ponto as tendências seguem caminhos totalmente opostos. No caso da presença combinada das duas bactérias, a tendência crescente manteve-se até ao grau mais severo de peeira. Por outro lado, a detecção isolada do agente etiológico da peeira passa a registar mesmo um ponto de inflexão no *score* 2, sendo que a partir desse momento verifica-se um decréscimo acentuado nas lesões mais severas. Assim, compreende-se que as amostras em que se detetam as duas bactérias exibam o dobro da possibilidade de pertencerem a lesões severas de peeira (*score*  $\geq 3$ ), comparativamente com aquelas em que se detetou exclusivamente *D. nodosus*.

A interpretação conjugada dos dados relativos à severidade das lesões e da evolução da detecção dos dois agentes bacterianos, evidencia que a presença de *D. nodosus* é o elemento indispensável para iniciar o processo de desenvolvimento da doença. Contudo, as lesões só terão condições de atingirem os *scores* mais severos (3 ou 4) se a bactéria *F. necrophorum* também estiver presente nos dígitos do animal. Assim, estas conclusões surgem em consonância com as hipóteses apresentadas por Clifton & Green (2016) e por Atia *et al.* (2017), em que os autores apontam para que o papel do *F. necrophorum* seja predominantemente o de um agente oportunista secundário. Podemos, assim, assumir que a bactéria *F. necrophorum* tem a capacidade de exacerbar a gravidade das lesões que foram inicialmente induzidas pela colonização do *D. nodosus*. Segundo este cenário, parece ser de rejeitar a hipótese adiantada há várias décadas por Roberts & Egerton (1969), segundo os quais o agente *F. necrophorum* desempenhava um papel essencialmente de precursor na patogénese da peeira.

Relativamente à virulência das estirpes de *D. nodosus*, a técnica de PCR utilizada por Albuquerque (2019) detetou o gene *aprV2* em 96,2% das 132 amostras avaliadas. Nas restantes estirpes de *D. nodosus* não foi possível encontrar nenhum dos genes *aprB2* ou *aprV2*. Deste modo, se excluirmos as amostras em que o resultado foi inconclusivo, constatamos que a técnica de diagnóstico utilizada revelou que todas as estirpes de *D. nodosus* avaliadas foram classificadas como virulentas. Recordemos que o trabalho de

McPherson *et al.* (2017) também já tinha adiantado a hipótese de que o gene *aprV2* nem sempre pode ser associado às estirpes virulentas. Esta conclusão deveu-se ao facto de os autores terem detetado o referido gene em estirpes sem capacidade elastolítica, e que por isso não conseguiram induzir o desenvolvimento de lesões mais graves. Assim, admitimos que a aplicação deste meio de diagnóstico não seja a opção mais favorável para discriminar a virulência das estirpes de *D. nodosus* presentes no Alentejo, já que aquela técnica levou à atribuição da mesma classificação a todas elas, sendo pouco provável que na realidade todas apresentem o mesmo grau de virulência.

No caso dos trabalhos de Jiménez *et al.* (2003), os resultados apresentados demonstraram que a fração de bactérias pertencente à espécie *D. nodosus* que foram classificadas como virulentas foi relativamente diminuta (24,1%). Evidentemente que este resultado não é diretamente comparável com o obtido no trabalho de Albuquerque (2019). De facto, o ensaio da autora avaliou a presença de segmentos genéticos específicos através do PCR em tempo real, enquanto os resultados relativos ao estudo que decorreu há duas décadas derivaram da identificação da capacidade elastolítica das bactérias. Assim, podemos referir que não será de estranhar a diferença entre as conclusões dos dois ensaios, uma vez que Dhungyel *et al.* (2013a) demonstraram que existe uma fraca concordância entre a aplicação das técnicas fenotípicas e moleculares aplicadas às mesmas amostras. Apesar das técnicas de diagnóstico molecular estarem associadas a uma maior precisão dos resultados (Frosth, 2016), a falha na identificação de qualquer estirpe que fosse classificada como benigna sugere que deva ser experimentada uma abordagem diferente. Assim, a solução ideal seria que os estudos de metagenómica realizados às amostras de *D. nodosus* recolhidas no Alentejo, que estão a ser desenvolvidos no âmbito do projeto GEN-RES-ALENTEJO, permitissem proceder à identificação de novos segmentos genéticos que também fossem responsáveis pela discriminação entre estirpes virulentas ou benignas. Caso tal não seja possível, pensamos que se torna pertinente voltar a utilizar os testes fenotípicos, seja pela aplicação do teste da gelatina em gel, como foi utilizado nos trabalhos de Stewart (1979), ou pelo teste da elastase, já implementado no ensaio de Palmer (1993), a fim de dispor de alguma informação que permita efetivamente discriminar as estirpes de *D. nodosus* entre benignas e virulentas.

A análise dos serogrupos realizada por Albuquerque (2019) utilizou a técnica de PCR *multiplex*, seguindo uma metodologia idêntica à descrita por Frosth *et al.* (2015). Os resultados obtidos permitiram a identificação de seis diferentes serogrupos, pertencentes tanto à classe I (B, C, F e G) como à classe II (D e H). Esta diversidade de grupos revela-se algo surpreendente, uma vez que só foram conseguidos resultados válidos para um lote reduzido de amostras (n=29), correspondente a cerca de metade das estirpes de *D. nodosus* testadas. O serogrupo B foi aquele que se destacou claramente dos demais, correspondendo a 65,5% dos grupos detetados. O facto de ser este o grupo mais prevalente não será motivo de grande surpresa, uma vez que este é

o grupo que exibe uma maior dispersão a nível global (Claxton, 1989). A situação de este serogrupo já ter sido diagnosticado em quase todos os países que têm casos de peeira deve-se, em grande parte, ao facto de este abranger seis serotipos (B1–B6), enquanto os restantes contemplam um máximo de dois serotipos (Bhat *et al.*, 2012).

O segundo serogrupo mais prevalente foi o C, que apesar de não ser muito recorrente nos países que correspondem aos maiores produtores de ovinos a nível mundial (Claxton, 1989), é um dos mais frequentes na vizinha Espanha (Hurtado *et al.*, 1998). A partilha destes serogrupos entre os dois países ibéricos poderá ser influenciada pelas frequentes trocas comerciais registadas entre o Alentejo e a Extremadura espanhola (Castro, 2013), que também abrangem o setor agropecuário. Os trabalhos de Campos *et al.* (2020) revelaram uma proximidade genética marcada entre os ovinos dos dois países, o que comprova a existência de uma conexão entre os efetivos portugueses e espanhol desde há bastante tempo. Esta situação também poderá ajudar a justificar esta partilha de serogrupos entre os ovinos dos dois países.

De forma algo inesperada, nenhum dos dois serogrupos mais recorrentemente identificados na investigação de Albuquerque (2019) constam dos resultados relatados por Jiménez *et al.* (2003) para a região Alentejo. Esta diferença notória dever-se-á à menor dimensão da amostra recolhida nesse trabalho, quer em termos do número de explorações quer de ovinos contemplados. Outro dos motivos na base desta divergência poderá residir no facto de ambos os estudos terem sido espaçados por duas décadas, não sendo impossível que durante esse período tenha ocorrido a introdução de estirpes de *D. nodosus* de algum novo serogrupo na região. De facto, este cenário não pode ser menosprezado, uma vez que a referida bactéria tem a capacidade de se alojar em lesões crípticas nas úngulas dos ovinos durante largos meses (Bennett & Hickford, 2011), podendo essa estirpe bacteriana ter sido introduzida na região após importação de animais infetados com o agente, mesmo que não apresentassem os sinais clínicos característicos da infeção por peeira.

O trabalho de Jiménez *et al.* (2003) permitiu a identificação de três serogrupos, sendo eles o D, o F e o I. Os dois primeiros também foram detetados na amostragem recolhida na nossa investigação, no entanto o serogrupo I não consta dos resultados apresentados por Albuquerque (2019). Não será de todo impossível que o referido serogrupo tenha sido erradicado da região durante os 20 anos que separaram as colheitas de amostras nos dois estudos. Ainda assim, temos plena consciência de que tal situação se revele altamente improvável, uma vez que não temos conhecimento de que tenham sido implementados quaisquer planos de erradicação ou de controlo que tenham sido executados de forma integrada a nível regional. Deste modo, acreditamos que a não identificação do serogrupo I neste trabalho possa estar relacionada com a reduzida quantidade de amostras em que foi possível determinar o serogrupo envolvido. Deste modo, acreditamos que o cenário mais provável seja que essas estirpes bacterianas

continuem a estar presentes na região. A única forma de poder refutar esta situação passa pela determinação dos serogrupos com base num maior número de amostras.

O facto de, no trabalho desenvolvido por Albuquerque (2019), num número considerável de estirpes de *D. nodosus* não se ter obtido um resultado de amplificação de PCR que fosse compatível com qualquer um dos nove serogrupos testados poderá ter várias justificações possíveis. Refira-se que a autora não analisou a presença do serogrupo M, devido à inexistência de *primers* que sirvam de referência para a sua identificação (Best *et al.*, 2018). Assim, uma das justificações poderá residir precisamente na hipótese de algumas dessas estirpes pertencerem ao serogrupo M, ou mesmo a algum novo serogrupo/serotipo que ainda não tenha sido diagnosticado previamente noutros estudos, tal como descrito nos trabalhos de Bhat *et al.*, (2013).

Outra possibilidade, que também é adiantada no estudo de Albuquerque (2019), está relacionada com a eventualidade de existirem no mesmo membro estirpes de *D. nodosus* pertencentes a diversos serogrupos. Este cenário já tinha sido descrito nos trabalhos de Zhou & Hickford (2000), tendo sido detetadas até sete estirpes diferentes no mesmo membro de cada animal. Assim, a autora sugere que possa ocorrer uma diminuição da sensibilidade da técnica do PCR *multiplex* quando estejam presentes diferentes serogrupos de *D. nodosus* na mesma amostra. Recordemos que nos resultados publicados não se verificou a deteção de dois ou mais serogrupos em nenhuma das amostras analisadas.

Por um motivo similar, também podemos adiantar a hipótese de que a técnica de diagnóstico utilizada não consiga detetar tão facilmente a presença de *D. nodosus* se estiver presente uma grande quantidade de outros agentes microbianos, apesar da elevada sensibilidade do PCR (Frosth, 2016). Será importante referir que os problemas de incapacidade de determinação do serogrupo em várias estirpes de *D. nodosus* já foram relatados nos trabalhos Frosth *et al.* (2015) e Best *et al.* (2018). Nesses estudos já haviam sido adiantadas algumas justificações idênticas, sendo que o cenário mais provável será que todas elas apresentem uma parte da responsabilidade pela obtenção de resultados inconclusivos, mas evidentemente que serão necessárias averiguações sobre esta temática para apresentar respostas concretas e rigorosas.

De forma resumida, entre os 6 serogrupos identificados por Albuquerque (2019), apenas dois (D e F) já haviam sido reconhecidos na investigação de Jiménez *et al.* (2003). Admitindo que tais resultados sejam válidos, esta situação demonstra que a diversidade genética do agente etiológico da peeira é atualmente mais marcada do que a que se registava há duas décadas. Tal situação poderá ter graves implicações em termos de sucesso da aplicação de um protocolo vacinal. Segundo a amostra recolhida nos 689 *Inquéritos Epidemiológicos*, cujos resultados foram apresentados no Capítulo 3, apenas 81 produtores assumem utilizar uma vacina para a peeira. Entre esses, 96,3% elegeram a vacina comercial Footvax® (*MSD Animal Health*) para utilizar nos seus rebanhos. É

verdade que esta vacina contém estirpes inativadas referentes a nove serogrupos (apenas não contempla o grupo M), contudo a utilização de vacinas multivalentes confere uma fraca produção de anticorpos devido à competição antigénica verificada entre serogrupos (Schwartzkoff *et al.*, 1993; Hunt *et al.*, 1994), o que se traduz numa reduzida e pouco duradoura imunidade (Dhungyel *et al.*, 2014). Por seu lado, a utilização de vacinas monovalentes ou bivalentes tem-se revelado mais eficiente em termos de qualidade e duração da imunidade (Dhungyel *et al.*, 2014), tendo mesmo sido a estratégia responsável pela erradicação da peeira em países como o Butão (Gurung *et al.*, 2006) ou o Nepal (Egerton *et al.*, 2002).

Pelas indicações obtidas no nosso ensaio, em nove das dez explorações em que se conseguiram determinar os serogrupos presentes, seria possível implementar uma abordagem semelhante à implementada no Nepal (Egerton *et al.*, 2002). Nas explorações H, K, M, O e Q apenas se detetou um serogrupo, pelo que teoricamente apenas seria necessário utilizar uma vacina monovalente. No caso das explorações C, G, J e N, em que apenas se detetaram dois serogrupos diferentes, justificar-se-ia a utilização de vacinas bivalentes especificamente concebidas para estes serogrupos. Evidentemente que estas indicações são baseadas nas estirpes de *D. nodosus* detetadas em cada efetivo, mas antes de avançar para um procedimento desta natureza teríamos de estar seguros de estarmos a cobrir todos os serogrupos presentes, sendo preciso obter resultados relativos a uma amostragem mais substancial. Em nossa opinião, essa recolha de amostras poderia ser feita com recurso à passagem de uma zaragatoa em cada espaço interdigital, tal como o procedimento descrito por Frosth (2016). Deste modo, evitar-se-ia o uso da biópsia, que para além de ser uma técnica invasiva, também corresponde a um procedimento mais moroso e que envolve uma maior complexidade no que respeita a recursos humanos e materiais. Recordemos ainda que, segundo as conclusões de Stäuble *et al.* (2014), a colheita de amostras com recurso a biópsia não se revelou tão eficiente quanto a utilização de zaragatoa.

O único rebanho em que foi possível detetar três serogrupos diferentes (B, D e F) é o da exploração E. Nesta unidade pecuária não se recomenda, portanto, a utilização de uma abordagem idêntica à que foi preconizada para as restantes explorações. Aqui, sugere-se a utilização de uma estratégia similar à descrita por Dhungyel & Whittington (2010), uma vez que os autores defendem que nos efetivos afetados por diversos serogrupos devem ser utilizadas sucessivas vacinas bivalentes ou monovalentes, devendo ser intercaladas por períodos de três meses. Assim, uma vez que nesta exploração interessa conferir imunidade contra três serogrupos, propõe-se a utilização de uma vacina específica para dois desses grupos, sendo que passados 90 dias deverá aplicar-se uma vacina monovalente que cubra especificamente o grupo remanescente. A alternância entre essas duas vacinas deverá manter-se ao longo de todo o protocolo vacinal. Este plano deverá conferir uma imunidade adequada contra os três serogrupos alvo, sem que ocorram problemas relacionados com a competição antigénica (Dhungyel *et al.*, 2014).

Em Portugal não são comercializadas vacinas que sejam mono ou bivalentes que possam ser utilizadas nos planos vacinais atrás referidos. Assim, a opção mais válida será a utilização das vulgarmente designadas “vacinas de rebanho”, que são concebidas através das fímbricas das estirpes identificadas em cada exploração. A aplicação destas vacinas específicas já demonstrou ser bastante eficiente em ensaios clínicos na Oceânia, tal como revelam os trabalhos de Dhunghyel *et al.* (2008) e de Dhunghyel *et al.* (2013a). Ainda assim, temos plena consciência que no Alentejo ainda não existe o hábito de recorrer a estas vacinas para o combate à peeira, tal como revelam os resultados expostos no Capítulo 3, que demonstraram que apenas em 0,4% dos 689 inquiridos utilizam a “vacina de rebanho” como ferramenta de controlo da doença.

Admitimos que no Alentejo as “vacinas de rebanho” não sejam tão usadas como a vacina Footvax® por uma questão de falta de transmissão de informação junto dos produtores pecuários. Sem dúvida que as vacinas comerciais são mais práticas de utilizar, uma vez que não envolvem qualquer fase de recolha de amostras e não é necessário estar dependente do período destinado ao seu fabrico (Gurung *et al.*, 2006). Ainda assim, apesar de não existirem publicações relativas à aplicação no Alentejo da única vacina disponível no mercado, temos conhecimento de vários casos em que a sua utilização não tem conferido os resultados esperados. Nestes efetivos em particular, julgamos ser adequado ponderar a utilização da vacina específica para os serogrupos detetados em cada rebanho. Deste modo, seria necessário que os produtores pecuários tivessem conhecimento desta ferramenta que pode permitir progressos no controlo da peeira, sendo por isso de ponderar a realização de ações de formação que incidissem na divulgação dos benefícios desta opção preventiva. De forma lógica, terá de se reconhecer que uma vacina específica, concebida a partir dos agentes bacterianos detetados nos ovinos de cada rebanho, terá uma eficiência superior à das vacinas desenvolvidas com base em microrganismos isolados em localizações geográficas distintas.

## **6.5 – Conclusão**

As conclusões assumidas no presente capítulo têm por base os resultados apresentados por Albuquerque (2019), cujas análises de diagnóstico laboratorial da peeira foram aplicadas às amostras recolhidas nas tarefas apresentadas no decurso do Capítulo 5. O trabalho laboratorial desenvolvido foi coordenado pelo INIAV e CEBAL, na qualidade de entidades parceiras no projeto GEN-RES-ALENTEJO.

Os trabalhos de Albuquerque (2019) referem-se ao primeiro ensaio em que foram aplicadas técnicas moleculares para o diagnóstico de peeira em Portugal, contribuindo, deste modo, para o progresso do conhecimento que dispomos sobre esta doença. A análise conjunta dos resultados desse trabalho com aqueles que foram apresentados no

Capítulo 5 permitiram confirmar que, no caso particular do Alentejo, a doença afeta um elevado número de animais, pelo que interessa afinar as técnicas de diagnóstico, por forma a decidir de forma fundamentada em que áreas e de que forma se deve priorizar o combate ao problema.

Os resultados obtidos por Albuquerque (2019) permitiram detetar, de forma expressiva, as bactérias *D. nodosus* e *F. necrophorum* em amostras recolhidas diretamente das úngulas dos ovinos. A relação entre a probabilidade de deteção de cada um dos agentes nos diferentes graus lesionais permitiu confirmar o papel desempenhado por *D. nodosus* como elemento obrigatório para o início do processo de desenvolvimento da doença. Apesar de ainda não existir consenso entre a comunidade científica sobre qual o verdadeiro papel de *F. necrophorum*, os dados obtidos na nossa pesquisa apontam para a possibilidade deste se constituir como agente oportunista secundário, evidenciando que a presença desta bactéria é determinante para que as lesões alcancem os *scores* de severidade mais elevados.

Relativamente à determinação da virulência das estirpes, os resultados obtidos indicam que todas as que foram sujeitas a análise obtiveram a classificação de virulentas. Uma vez que a técnica utilizada não permitiu proceder à diferenciação entre as estirpes analisadas, cremos que futuramente deverá ser equacionada alguma forma alternativa, já que para as amostras recolhidas no Alentejo a deteção dos genes *aprB2/aprV2* não pareceu ser a técnica mais adequada. Deste modo, as análises de metagenómica que estão a decorrer no âmbito do Projeto GEN-RES-ALENTEJO, poderão ajudar a determinar outros genes que sejam responsáveis pela diferenciação entre estirpes virulentas e benignas.

Estamos convictos de que a identificação dos serogrupos presentes em cada um dos rebanhos analisados constituiu um avanço importante no sentido de controlar especificamente os agentes detetados em cada situação concreta. O alcance desta etapa poderá permitir a formulação de vacinas específicas para cada efetivo, ao invés de utilizar indiscriminadamente as vacinas multivalentes, que nem sempre demonstram a aptidão desejada na prevenção da doença. Todavia, para aferir e consolidar este processo será necessário desenvolver uma superior capacidade na determinação dos serogrupos, por forma a reduzir a quantidade de resultados inconclusivos com que nos deparámos. Apesar de terem sido adiantadas várias justificações para esta situação, continua a haver necessidade de as próximas pesquisas conseguirem averiguar de forma cabal e conclusiva a presença de estirpes pertencentes ao serogrupo M. Evidentemente que não se pode menosprezar a hipótese de estarmos também perante algum serogrupo novo, diferente dos 10 que até à data foram identificados, devendo esta questão ser merecedora de atenção.

## Conclusão geral e perspectivas futuras

O decorrer do presente estudo permitiu gerar diversos conhecimentos sobre a temática da peeira em ovinos numa região em que a carência de publicações científicas era bastante notória. Em determinadas análises efetuadas foi possível corroborar algumas das evidências já reportadas em outros territórios distintos, no entanto algumas avaliações indiciaram conclusões diferentes daquelas já publicadas na bibliografia que trata esta doença, apelando ao aprofundamento da reflexão sobre o porquê de tais situações se terem verificado.

Os diversos resultados alcançados já foram alvo de detalhada discussão ao longo dos capítulos que concretizam este trabalho, pelo que nesta secção procederemos apenas à recapitulação de algumas das principais conclusões que fomos reportando. Apesar de reconhecermos a inestimável valia dos resultados obtidos, temos plena consciência de que várias questões ficaram por responder pelo que entendemos que se justifica agora realçar quais os temas e questões que, em nossa opinião, apresentam uma maior pertinência para serem merecedores de análise detalhada em futuras investigações.

### ***Capítulo 2 – Avaliação da capacidade de reconhecimento de lesões de peeira pelos produtores de ovinos do Alentejo***

Iniciamos esta análise pelas indicações fornecidas pelos *Inquéritos de Validação*, tendo os resultados obtidos indiciado a existência de uma elevada capacidade de reconhecimento de lesões de peeira por parte dos produtores de ovinos no Alentejo. Este facto é relevante e assegura uma base de validade mais ampla para as conclusões que foram obtidas no decorrer dos trabalhos descritos nos capítulos subsequentes. Recordamos que a prevalência determinada nesta amostra (36%) está enquadrada no limite posteriormente calculado com base nos *Inquéritos Epidemiológicos* (IC 95% [30,54; 38,54]). Deste modo, podemos assumir que os 61 *Inquéritos de Validação* realizados foram representativos da população em análise.

Quando começámos a recolher as respostas junto dos produtores não sabíamos quantos *Inquéritos Epidemiológicos* seria possível obter, nem qual a prevalência estimada para a doença no Alentejo, pelo que tivemos que assumir valores expectáveis<sup>16</sup>. Deste modo, poderíamos presumir que a dimensão da amostra inicialmente calculada não se adequaria aos valores reais. Ainda assim, se aplicarmos os dados que foram efetivamente obtidos no Capítulo 3<sup>17</sup>, constatamos que a dimensão mínima da amostra

---

<sup>16</sup> n = 500 *Inquéritos Epidemiológicos*; prevalência na região = 50%

<sup>17</sup> n = 689 *Inquéritos Epidemiológicos*; prevalência na região = 34,5%

se altera para 57 inquéritos. Assim, o número de questionários aplicados continua a superar o valor mínimo exigido para os parâmetros definidos. Podemos então assumir que o propósito fundamental deste estudo pôde ser alcançado com a quantidade de respostas obtidas.

Para sustentar que a capacidade de deteção das lesões de peeira por parte dos produtores foi adequada, recordamos os resultados apresentados no Capítulo 5, os quais confirmaram a existência de casos clínicos de peeira em 17 herdades em que tinha sido assumida a presença da doença pelos produtores.

As respostas fornecidas por estes questionários permitiram conferir que existem outras afeções podais que são observadas em explorações de ovinos do Alentejo. A ocorrência do granuloma digital, que surge como consequência de um uso incorreto do recorte corretivo das úngulas, foi uma das lesões reportadas. Assim, a presença desta afeção acaba por ocorrer de forma algo natural, uma vez que 42% dos produtores realizam sessões de podiatria com regularidade, aumentando esse valor para 87%, caso consideremos apenas os efetivos com peeira.

Outras das afeções identificadas foram o abcesso podal e a doença da linha branca. A etiologia de ambas ainda não está totalmente esclarecida, mas parece consensual que as carências nutricionais e as condições do solo desempenhem um papel determinante no desenvolvimento de ambas. Assim, a deteção destas afeções poderá ser justificada com dados recolhidos nos *Inquéritos Epidemiológicos*. Por exemplo, a existência de pedras como responsáveis por traumatismos nas úngulas dos ovinos foi reportada por 25% dos inquiridos. No que respeita a possíveis carências nutricionais, estas poderão ser explicadas em alguma medida pelo facto de aproximadamente metade dos produtores não complementarem a dieta dos ovinos com alimento concentrado. Adicionalmente, em mais de 60% dos efetivos não se recorre a qualquer tipo de suplementação mineral ou vitamínica em qualquer período do ano. A combinação destes fatores poderá assim predispor à ocorrência destas afeções podais.

Ainda com base nos resultados expostos neste capítulo, um aspeto que consideramos necessário que seja cabalmente esclarecido é a indicação, admitida por cerca de 10% dos inquiridos, de que já foram observadas lesões idênticas àquelas que caracterizam os casos de DDCO. Tal como referido, a observação de cerca de 13000 membros de ovinos, relatada no Capítulo 5, não detetou qualquer lesão que fosse compatível com a DDCO, algo que descredibiliza essa indicação. Ainda assim, não podemos descartar esta hipótese de forma plena, já que as técnicas de diagnóstico referidas no Capítulo 6 não foram dirigidas ao agente *Treponema*, pelo que não recolhemos qualquer indicação sobre a presença ou ausência do agente. Apesar de até à presente data não serem conhecidos quaisquer relatos desta afeção em Portugal, seria conveniente aferir com maior rigor esta situação, pelo que consideramos pertinente aprofundar as investigações sobre este assunto.

### **Capítulo 3 – Identificação de fatores de risco para a ocorrência de peeira em explorações de ovinos no Alentejo**

A aplicação dos *Inquéritos Epidemiológicos* num expressivo número de unidades pecuárias permitiu identificar correlações estatísticas significativas entre a ocorrência de casos de peeira e determinados fatores relacionados com o manejo e com outras características de cada exploração. As explorações que apresentaram um risco acrescido de exposição à doença foram aquelas que: possuem efetivos de maior dimensão; aplicam um manejo reprodutivo com épocas de cobrição e partos concentradas no plano temporal; pastoreiam os seus animais em áreas de baixa altitude e com fraca capacidade de drenagem. Também a utilização de áreas de montado como local de permanência dos ovinos evidenciou uma correlação positiva estatisticamente significativa com a ocorrência de casos de peeira. Porém, pelos motivos já adiantados, torna-se necessário proceder a uma interpretação cautelosa sobre este fator, visto que a variável está correlacionada com outras já identificadas como fatores de risco para aquela doença. Seria útil proceder a análises suplementares, através da recolha de amostras de solo nas áreas do montado alentejano, por forma a determinar se as respetivas condições físico-químicas se adequam às que garantem a sobrevivência da bactéria *D. nodosus*.

As estratégias de tratamento e controlo que são utilizadas para impedir o avanço da peeira também foram analisadas, tendo sido reconhecido que a separação dos animais clinicamente afetados do restante rebanho constituiu um fator de proteção para conter a disseminação da doença. Em sentido inverso, tanto a utilização do pedilúvio como a antibioterapia aplicada por via tópica revelaram-se como potenciais fatores de risco, já que foram tendencialmente associados aos efetivos em que existe uma maior proporção de animais afetados pela doença. É, no entanto, necessário recordar que a obtenção de conclusões inequívocas sobre a relação causa-efeito entre a presença da doença e as opções orientadas para o seu controlo/tratamento só será possível quando for implementado um estudo de carácter longitudinal, ao invés de uma avaliação transversal como aquela que foi realizada. Consideramos assim que será crucial que um estudo desta natureza seja desenhado e executado no Alentejo.

### **Capítulo 4 – Caracterização bioclimática e análise de agregados espaciais da peeira no Alentejo**

A utilização de ferramentas de georreferenciação permitiu avaliar a importância relativa dos fatores climáticos na ocorrência de casos de peeira nas explorações. O referido procedimento permitiu confirmar a relevância que o volume de precipitação desempenha na expressão da doença, tal como já tinha sido adiantado em outros países. No caso da temperatura ambiente, os resultados, aparentemente discordantes se

comparados diretamente com os que são descritos na literatura empírica, justificam-se pelas particularidades sazonais verificadas no clima mediterrânico, onde a pluviosidade é mais abundante durante as estações mais frias.

No caso da análise do tipo de solo, a metodologia implementada não permitiu confirmar a mesma tendência já expressa em ensaios realizados em outros contextos epidemiológicos. Todavia, para termos resultados mais fidedignos sobre qual o efeito do tipo de solo na expressão da doença, recomendamos que sejam realizadas análises químicas aos diferentes tipos de solo existentes no Alentejo, com o intuito de avaliar a capacidade de desenvolvimento do agente *D. nodosus* em cada um dos diferentes perfis de solo encontrados na região.

A utilização das ferramentas de análise de agregados espaciais permitiu identificar a localização de *clusters* para a peeira no Alentejo, onde se destaca aquele que se situa no concelho de Montemor-o-Novo. Ainda assim, é expectável que a recolha de uma amostra mais alargada em outras áreas também permita identificar outros *hotspots*, já que existem outros locais em que as condições pluviométricas também se adequam às características que favorecem a expressão dos agentes envolvidos na patogénese da doença.

## **Capítulo 5 – Caracterização clínica da peeira ovina em explorações do Alentejo**

O ensaio desenvolvido neste capítulo permitiu confirmar a relevância que a peeira desempenha em explorações de ovinos do Alentejo. Adicionalmente, também ficou demonstrado que a forma de expressão da doença no seio de cada rebanho pode ser totalmente distinta, já que em algumas unidades o número de animais afetados teve uma expressão residual, enquanto em outros a proporção de ovinos clinicamente acometidos pela doença atingiu valores bastante significativos.

A análise desenvolvida também permitiu identificar alguns dos aspetos relacionados com o próprio hospedeiro que podem constituir fatores de risco para a expressão da doença. Os fatores que, segundo este estudo, forneceram evidências de estarem associados a uma maior resistência à peeira expressaram-se nos animais do sexo feminino, nos de menor idade e nos de raça merina preta.

A comparação entre os *scores* lesionais registados nas duas observações confirmou que estamos perante uma doença bastante dinâmica, já que uma proporção apreciável dos graus das lesões sofreu alterações pronunciadas entre as duas visitas. Do cruzamento das situações em que houve alteração na fração de animais afetados com os parâmetros referentes aos fatores climáticos, resultou que o nível de precipitação registado no período que antecedeu cada uma das visitas foi identificado como o principal fator de risco para a doença. No que respeita às opções terapêuticas e profiláticas, a análise

efetuada detetou que a vacinação e a separação dos animais afetados do rebanho constituem fatores protetores para os ovinos, já que estão associados a uma diminuição da probabilidade de serem detetadas lesões de peeira.

Em termos futuros, acreditamos que se justifica a realização de um estudo segundo uma metodologia diferente. Assim, em vez de privilegiarmos a observação de um elevado número de animais, tal como foi realizado neste ensaio, pensamos que se pode justificar a preferência por um superior número de observações em cada animal. Um estudo com essas características possibilitaria caracterizar de forma mais exaustiva a evolução das lesões de peeira. Adicionalmente, poderíamos realizar uma análise de correlação mais fidedigna entre a evolução da doença e as variações verificadas tanto a nível dos parâmetros meteorológicos como no que respeita à aplicação de diversas metodologias terapêuticas.

### **Capítulo 6 – *Relação entre os graus de severidade das lesões de peeira e a presença dos agentes *D. nodosus* e *F. necrophorum****

Os resultados exibidos neste trabalho comprovaram a existência de uma relação entre a presença das bactérias *D. nodosus* e *F. necrophorum* e o aumento da severidade das lesões de peeira. Apesar de ainda não existir consenso na literatura de referência quanto ao papel desempenhado por cada um dos agentes, a proporção de deteção de cada um nos diferentes *scores* sugere que a função de precursor da doença seja circunscrita à ação específica de *D. nodosus*, na qualidade de verdadeiro agente etiológico da doença, enquanto à bactéria *F. necrophorum* deva ser atribuído um papel de agente oportunista secundário.

Reconhecemos que as provas laboratoriais utilizadas na investigação de Albuquerque (2019) não apresentaram a capacidade esperada de distinguir a virulência das diferentes estirpes de *D. nodosus*. Deste modo, cremos que seria necessário reanalisar as amostras recolhidas com outro tipo de técnicas que possibilitassem efetivamente diferenciar entre estirpes benignas e virulentas, já que é altamente improvável que todas as estirpes identificadas se incluam na mesma categoria de virulência. Numa situação ideal, seria um enorme progresso se a análise ao genoma da bactéria permitisse identificar novos genes que estivessem diretamente relacionados com a virulência de cada estirpe. Caso se alcançasse esse objetivo, estaríamos perante um grande avanço na capacidade de avaliar a patogenicidade dos agentes identificados em cada efetivo.

Relativamente aos serogrupos detetados no trabalho de Albuquerque (2019), pudemos reconhecer a existência de seis grupos na região Alentejo, o que comprova a diversidade genética da bactéria *D. nodosus*. Não obstante esta variedade, podemos referir que, dentro de cada exploração, a presença de múltiplos serogrupos foi algo limitada, sendo que na grande maioria só se identificaram um ou dois grupos em cada rebanho. Em

termos práticos, esta conclusão traduz-se no facto de a aplicação de um programa de controlo com recurso a uma vacina mono ou bivalente pudesse ser considerada como uma opção adequada. Todavia, os dados recolhidos nos *Inquéritos Epidemiológicos* revelaram que o recurso a este tipo de vacinas não é prática vigente no Alentejo. De facto, as vacinas multivalentes são recorrentemente utilizadas, embora persistam dúvidas sobre a sua real eficácia no que diz respeito à duração e à qualidade da imunidade que as mesmas conferem.

Queremos, no entanto, ressaltar que as análises de determinação dos serogrupos revelaram alguns resultados inconclusivos. Uma das possibilidades para esta situação pode estar relacionada com a falta de precisão da técnica de PCR, apesar da elevada sensibilidade da mesma. Outra hipótese apontada está relacionada com a eventualidade de algumas das estirpes pertencerem ao serogrupo M, ou mesmo a algum outro que ainda não tenha sido diagnosticado nos estudos previamente publicados. Recordamos que no trabalho de Albuquerque (2019) apenas foram utilizados os *primers* específicos para os serogrupos A-I, pelo que a técnica não tem a capacidade de identificar mais nenhum serogrupo diferente desses. Esta última possibilidade necessita evidentemente de ser esclarecida, pelo que deverá ser merecedora de investigação futura. É expectável que possam ser obtidas algumas respostas a questões-chave aquando da conclusão da análise metagenómica que está a ser concretizada nos trabalhos do Projeto GEN-RES-ALENTEJO.

Para finalizar, queremos deixar patente que acreditamos que a realização deste trabalho tenha permitido melhorar o nível de informação e de conhecimento sobre uma temática que praticamente ainda não tinha sido alvo de estudos abrangentes nesta região. Naturalmente que, não obstante os aspetos que foram esclarecidos e as respostas que foram obtidas, continuam a existir múltiplas questões que necessitam de análises mais aprofundadas e orientadas para aspetos específicos. Cremos que se tal for realizado, tendo por base as pistas de investigação que este trabalho abriu, seguramente serão alcançadas respostas mais concludentes no sentido de melhor compreender esta doença e a forma de podermos atuar sobre ela com maior eficiência.

Em termos futuros, e tendo em conta que a terapêutica baseada na antibioterapia tem vindo a ser cada vez mais limitada pelas autoridades sanitárias devido a questões de saúde pública, acreditamos que o combate a esta doença tenha de passar inevitavelmente pela adoção de medidas preventivas mais competentes. No que se refere à vacinação, e de acordo com as ferramentas que atualmente se encontram disponíveis, temos que recomendar a utilização de vacinas que se adequem especificamente às bactérias presentes em cada efetivo. Ainda assim, estamos conscientes que a eventual descoberta de uma vacina que pudesse ser transversal aos vários serogrupos constituiria um enorme avanço científico, com impacto a nível global,

pelo que pensamos que os trabalhos de investigação futuros devam ser canalizados para esta área.

Não nos podemos, no entanto, esquecer que o efeito protetor conferido pelas vacinas não será duradouro se, a qualquer momento, o protocolo vacinal for interrompido. Deste modo, pensamos que a comunidade científica deverá continuar a apostar no desenvolvimento de estudos que permitam caracterizar o genoma dos ovinos, por forma a desenvolver adequados programas de seleção genética, já que é expectável que os mesmos possam gradualmente tornar os efetivos pecuários cada vez mais resilientes à peeira. Caso esses ensaios sejam dotados de sucesso e se consigam identificar marcadores genéticos responsáveis pela resistência à doença (objetivo a ser prosseguido pelos trabalhos do projeto GEN-RES-ALENTEJO), os efeitos benéficos serão duradouros e prolongados no tempo, sendo possível melhorar a produtividade das explorações pecuárias.

## Bibliografia

- Abbott, K. A. (2000). The Epidemiology of intermediate footrot. Veterinary sciences doctoral thesis at the University of Sidney, Australia.
- Abbott, K. A., Lewis, C. J. (2005). Current approaches to the management of ovine footrot. *Veterinary Journal*, 169(1), 28–41.  
<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2004.05.008>
- Albuquerque, C. (2019). Detection and characterization of *Dichelobacter nodosus* from sheep with different clinical manifestations of Ovine Footrot. Tese de mestrado em Biologia molecular e Genética na Universidade de Lisboa, Portugal.
- Allan, S. (2010). Foot abscess in sheep. *New Zealand Veterinary Journal*, 1(5), 128–128.  
<https://doi.org/10.1080/00480169.1953.33123>
- Allworth, M. B. (2014). Challenges in ovine footrot control. *Small Ruminant Research*, 118(1–3), 110–113. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2013.12.007>
- Angell, J. W., Duncan, J. S., Carter, S. D., Grove-White, D. H. (2014). Farmer reported prevalence and factors associated with contagious ovine digital dermatitis in Wales: A questionnaire of 511 sheep farmers. *Preventive Veterinary Medicine*, 113(1), 132–138. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2013.09.014>
- Angell, J. W., Grove-White, D. H., Duncan, J. S. (2015). Sheep and farm level factors associated with contagious ovine digital dermatitis: A longitudinal repeated cross-sectional study of sheep on six farms. *Preventive Veterinary Medicine*, 122(1–2), 107–120. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.09.016>
- Angell, J. W., Grove-White, D. H., Duncan, J. S. (2018). Sheep and farm level factors associated with footrot: a longitudinal repeated cross-sectional study of sheep on six farms. *Veterinary Record*, 1–7. <https://doi.org/10.1136/vr.104553>
- Arnoczky, S. P., Delos, D., Rodeo, S. A. (2011). What Is Platelet-Rich Plasma? *Operative Techniques in Sports Medicine*, 19, 142–148.  
<https://doi.org/10.1053/j.otsm.2010.12.001>
- Atia, J., Monaghan, E., Kaler, J., Purdy, K., Green, L., Keeling, M. (2017). Mathematical modeling of ovine footrot in the UK: the effect of *Dichelobacter nodosus* and *Fusobacterium necrophorum* on the disease dynamics. *Epidemics*, 21, 13–20.  
<https://doi.org/10.1016/j.epidem.2017.04.001>
- Bennett, G., Hickford, J., Sedcole, R., Zhou, H. (2009). *Dichelobacter nodosus*, *Fusobacterium necrophorum* and the epidemiology of footrot. *Anaerobe*, 15(4), 173–176. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2009.02.002>
- Bennett, G. N., Hickford, J. G. H. (2011). Ovine footrot: New approaches to an old disease. *Veterinary Microbiology*, 148(1), 1–7.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.09.003>

- Best, C. M., Roden, J., Pyatt, A. Z., Behnke, M., Phillips, K. (2020). Uptake of the lameness Five-Point Plan and its association with farmer-reported lameness prevalence: A cross-sectional study of 532 UK sheep farmers. *Preventive Veterinary Medicine*, *181*, 105064. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.105064>
- Best, N., Gwozdz, J., Suter, R., Rawlin, G., Beddoe, T. (2018). Direct serogrouping of *Dichelobacter nodosus* from Victorian farms using conventional multiplex polymerase chain reaction. *BMC Research Notes*, *11*(1), 4–9. <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3229-5>
- Beveridge, W. I. B. (1941). Foot-rot in sheep: a transmissible disease due to infection with *Fusiformis nodosus* (n.sp.). Studies on its Cause, *Epidemiology and Control. Council for Scientific and Industrial Research*. Bull 140(14) 1–56.
- Bhat, M. A., Wani, S. A., Hussain, I., Magray, S. N., Muzafar, M. (2012). Identification of two new serotypes within serogroup B of *Dichelobacter nodosus*. *Anaerobe*, *18*(1), 91–95. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.12.010>
- Bhat, M. A., Wani, S. A., Muzafar, M., Rather, M. A., Taku, A. K., Khandey, F. (2013). Non-specificity of primers used for PCR based serogrouping of *Dichelobacter nodosus* and identification of a novel *D. nodosus* strain. *Anaerobe*, *21*, 58–61. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.03.009>
- Billington, S. J., Johnston, J. L., Rood, J. I. (1996). Virulence regions and virulence factors of the ovine footrot pathogen, *Dichelobacter nodosus*. *FEMS Microbiology Letters*, *145*, 147–156.
- Bishop, S. C., Morris, C. A. (2007). Genetics of disease resistance in sheep and goats. *Small Ruminant Research*, *70*, 48–59. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2007.01.006>
- Caetano, P., Bettencourt, E., Branco, S. (2018). Reviewing Footrot in Sheep Aetiology Pathogenesis Risk Factors Associated with Footrot. *Journal of Veterinary Science & Animal Husbandry*, *6*(4), 405–413. <http://hdl.handle.net/10174/24101>
- Calvo-Bado, L. A., Oakley, B., Dowd, S., Green, L. E., Medley, G. F., Ul-Hassan, A., Bateman, V., Gaze, W., Witcomb, L., Grogono-thomas, R., Kaler, J., Russell, C., Wellington, E. M. H. (2011). Ovine pedomics: the first study of the ovine foot 16S rRNA-based microbiome. *The International Society for Microbial Ecology Journal*, *5*, 1426–1437.
- Campbell, I. (2007). Chi-squared and Fisher–Irwin tests of two-by-two tables with small sample recommendations. *Statistics in Medicine*, *26*, 3661–3675. <https://doi.org/10.1002/sim>
- Campos, E., Cuéllar, J., Salvador, O., García-Trejo, E. A., Pereira, F. (2020). The genetic diversity and phylogeography of Mexican domestic sheep. *Small Ruminant Research*, *187*(April), 106109. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2020.106109>

- Carolino, N., Monteiro, M., Madeira, M., Santos, J., Tábuas, L., Branco, S., Bettencourt, E., Ludovina, P., Romão, R., Caetano, P., Damião, P., Dias, C., Bettencourt, C., Ramos, A.M. e Matos, C. (2019). Parâmetros genéticos da peira em ovinos das raças Merina Branca e Merina Preta em Portugal. *Proceedings do XX Simpósio Iberoamericano sobre Conservação e Utilização de Recursos Zootécnicos*. Corumbá, Brasil.
- Carvalho, M. (2018). O papel da pastagem na recuperação do solo no montado. *Pastagens e Forragens*, 35, 1–21.
- Carvalho, D., Cardoso Pereira, S., Rocha, A. (2020). Future surface temperature changes for the Iberian Peninsula according to EURO-CORDEX climate projections. *Climate Dynamics*. <https://doi.org/10.1007/s00382-020-05472-3>
- Castro, M. (2013). A fronteira Portugal/Espanha, 18 anos depois de Schengen. O caso de Portalegre/Elvas - Valência de Alcântara/Badajoz. Tese de doutoramento em geografia na Universidade de Lisboa, Portugal.
- Chaiyos, J., Suwannatrai, K., Thinkhamrop, K., Pratumchart, K., Sereewong, C., Tesana, S., Kaewkes, S., Sripa, B., Wongsaroj, T., Suwannatrai, A. T. (2018). MaxEnt modeling of soil-transmitted helminth infection distributions in Thailand. *Parasitology Research*, 117(11), 3507–3517. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-6048-7>
- Chamberlain, G. (1982). Multivariate regression models for panel data. *Journal of Econometrics*, 18(1), 5–46. [https://doi.org/10.1016/0304-4076\(82\)90094-X](https://doi.org/10.1016/0304-4076(82)90094-X)
- Cheetham, B. F., Tanjung, L. R., Sutherland, M., Druitt, J., Green, G., McFarlane, J., Bailey, G. D., Seaman, J. T., Katz, M. E. (2006). Improved diagnosis of virulent ovine footrot using the intA gene. *Veterinary Microbiology*, 116, 166–174. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.04.018>
- Chetwin, D. H., Whitehead, L. C., Thorley, S. E. J. (1991). The recognition and prevalence of *Bacteroides nodosus* serotype M in Australia and New Zealand. *Australian Veterinary Journal*, 68(4), 154–155.
- Claxton, P. D., Ribeiro, L. A., Egerton, J. R. (1983). Classification of *Bacteroides nodosus* by agglutination tests. *Australian Veterinary Journal*, 60(11), 331–334.
- Claxton, P. D. (1989) Antigenic classification of *Bacteroides nodosus*. In: Egerton, J.R., Yong, W.K., Riffkin, G.G. (Eds.) Footrot and Foot Abscess of Ruminants. CRC Press, Boca Raton, United States. 155–165.
- Clifton, R., Green, L. (2016). Pathogenesis of ovine footrot disease: A complex picture. *Veterinary Record*, 179(9), 225–227. <https://doi.org/10.1136/vr.i4554>
- Conington, J., Hosie, B., Nieuwhof, G. J., Bishop, S. C., Bünger, L. (2008). Breeding for resistance to footrot - The use of hoof lesion scoring to quantify footrot in sheep. *Veterinary Research Communications*, 32(8), 583–589. <https://doi.org/10.1007/s11259-008-9062-x>

- Conington, Joanne, Nicoll, L., Mitchell, S., Bünger, L. (2010). Characterisation of white line degeneration in sheep and evidence for genetic influences on its occurrence. *Veterinary Research Communications*, 34(5), 481–489. <https://doi.org/10.1007/s11259-010-9416-z>
- Davies, I. (2011). Treatment options for contagious ovine digital dermatitis. *Veterinary Record*, 169, 604–605. <https://doi.org/10.1136/vr.d4394>
- Delle Site, P., Kilani, K., Gatta, V., Marcucci, E., de Palma, A. (2019). Estimation of consistent Logit and Probit models using best, worst and best–worst choices. *Transportation Research Part B: Methodological*, 128, 87–106. <https://doi.org/10.1016/j.trb.2019.07.014>
- Dewhirst, F. E., Paster, B. J., La Fontaine, S., Rood, J. I. (1990). Transfer of *Kingella indologenes* (Snell and Lapage 1976) to the genus *Suttonella* gen. nov. as *Suttonella indologenes* comb. nov.; transfer of *Bacteroides nodosus* (Beveridge 1941) to the genus *Dichelobacter* gen. nov. as *Dichelobacter nodosus* comb. nov.; and. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 40(4), 426–433. <https://doi.org/10.1099/00207713-40-4-426>
- Dhungyel, O. P., Hunter, J., Whittington, R. (2014). Footrot vaccines and vaccination. *Vaccine*, 32(26), 3139–3146. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.04.006>
- Dhungyel, O. P., Lehmann, D. R., Whittington, R. J. (2008). Pilot trials in Australia on eradication of footrot by flock specific vaccination. *Veterinary Microbiology*, 132, 364–371. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.05.027>
- Dhungyel, O. P., Whittington, R. J., Egerton, J. R. (2002). Serogroup specific single and multiplex PCR with pre-enrichment culture and immuno-magnetic bead capture for identifying strains of *D. nodosus* in sheep with footrot prior to vaccination. *Molecular and Cellular Probes*, 16, 285–296. <https://doi.org/10.1006/mcpr.2002.0427>
- Dhungyel, O. P., Schiller, N., Eppleston, J., Lehmann, D., Nilon, P., Ewers, A., Whittington, R. (2013a). Outbreak-specific monovalent/bivalent vaccination to control and eradicate virulent ovine footrot. *Vaccine*, 31(13), 1701–1706. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.01.043>
- Dhungyel, O. P., Hill, A. E., Dhand, N. K., Whittington, R. J. (2013b). Comparative study of the commonly used virulence tests for laboratory diagnosis of ovine footrot caused by *Dichelobacter nodosus* in Australia. *Veterinary Microbiology*, 162(2–4), 756–760. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.09.028>
- Dhungyel, O. P., Whittington, R. J. (2010). Modulation of inter-vaccination interval to avoid antigenic competition in multivalent footrot (*Dichelobacter nodosus*) vaccines in sheep. *Vaccine*, 28, 470–473. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.10.012>
- Dohoo, I., Martin, W., Stryhn, H. (2010). *Veterinary Epidemiologic Research*. 2<sup>nd</sup> ed. VER Inc., Charlottetown, Canada.

- Diário da República nº 19/2013, 1º Suplemento, Série I de 28 de janeiro (2013). Decreto Lei nº 11-A/2013. Ministério do Ordenamento do Território. Lisboa, Portugal.
- Díaz, M., Johnson, I., Lazar, A., Piper, A. M., Gergle, D. (2018). Addressing age-related bias in sentiment analysis. *Proceedings of the 2018 CHI Conference on Human Factors in Computing Systems*, 6146–6150. <https://doi.org/10.24963/ijcai.2019/852>
- Di Loria, A., Veneziano, V., Piantedosi, D., Rinaldi, L., Cortese, L., Mezzino, L., Cringoli, G., Ciaramella, P. (2009). Evaluation of the FAMACHA system for detecting the severity of anaemia in sheep from southern Italy. *Veterinary Parasitology*, 161(1–2), 53–59. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.12.002>
- Dillman, D. (1991). The Design And Administration Of Mail Surveys. *Annual Review of Sociology*, 17(1), 225–249. <https://doi.org/10.1146/annurev.soc.17.1.225>
- Duncan, J. S., Grove-White, D., Moks, E., Carroll, D., Oultram, J. W., Phythian, C. J., Williams, H. W. (2012). Impact of footrot vaccination and antibiotic therapy on footrot and contagious ovine digital dermatitis. *Veterinary Record*, 170(18), 462. <https://doi.org/10.1136/vr.100363>
- Egerton, J. R. (1970). Successful vaccination of sheep against foot-rot. *Australian Veterinary Journal*, 46, 114–115.
- Egerton, J. R. (1974). Significance of *Fusiformis nodosus* serotypes in resistance of vaccinated sheep to experimental foot-rot. *Australian Veterinary Journal*, 50, 59–62.
- Egerton, J. R., Ghimire, S. C., Dhungyel, R., Shrestha, H. K., Joshi, H. D., Joshi, B. R., Abbott, K. A., Kristo, C. (2002). Eradication of virulent footrot from sheep and goats in an endemic area of Nepal and an evaluation of specific vaccination. *Veterinary Record*, 151, 290–295.
- Egerton, J. R., Parsonson, I. M., Graham, N. P. H. (1968). Parenteral chemotherapy of ovine foot-rot. *Australian Veterinary Journal*, 44, 275–283.
- Egerton, J. R., Parsonson, M. (1969). Benign foot-rot - A specific interdigital dermatitis of sheep associated with infection by less proteolytic strains of *Fusiformis nodosus*. *Australian Veterinary Journal*, 45, 345–349.
- Egerton, J. R., Roberts, D. S. (1971). Vaccination against ovine foot-rot. *Journal of Comparative Pathology*, 81, 179–185.
- Emery, D. L., Stewart, D. J., Clark, B. L. (1984). The comparative susceptibility of five breeds of sheep to foot-rot. *Australian Veterinary Journal*, 61(3), 85–88. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1984.tb15524.x>
- Escayg, A. P., Hickford, J. G. H., Bullock, D. W. (1997). Association between alleles of the ovine major histocompatibility complex and resistance to footrot. *Research in Veterinary Science*, 63, 283–287.

- Esgalhado, C., Guimarães, H., Debolini, M., Guiomar, N., Lardon, S., Ferraz de Oliveira, I. (2020). A holistic approach to land system dynamics – The Monfurado case in Alentejo, Portugal. *Land Use Policy*, 95(March), 104607. <https://doi.org/10.1016/j.landusepol.2020.104607>
- Echeverria, J. E., Rodriguez, A. N., Cortez, M. R., Diotaiuti, L. G., Gorla, D. E. (2017). Spatial and temporal distribution of house infestation by *Triatoma infestans* in the Toro Toro municipality, Potosi, Bolivia. *Parasites and Vectors*, 10(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-1984-0>
- Fick, S. E., Hijmans, R. J. (2017). WorldClim 2: new 1-km spatial resolution climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology*, 37(12), 4302–4315. <https://doi.org/10.1002/joc.5086>
- Fraga, H., Pinto, J. G., Santos, J. A. (2020). Olive tree irrigation as a climate change adaptation measure in Alentejo, Portugal. *Agricultural Water Management*, 237(June 2019), 106193. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2020.106193>
- Fraga, H., Santos, J. (2018). Vineyard mulching as a climate change adaptation measure: Future simulations for Alentejo, Portugal. *Agricultural Systems*, 164(April), 107–115. <https://doi.org/10.1016/j.agsy.2018.04.006>
- Frosth, S. (2016). *Dichelobacter nodosus* and Footrot in Swedish Sheep. Veterinary sciences doctoral thesis at the Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden.
- Frosth, S., König, U., Nyman, A. K., Pringle, M., Aspán, A. (2015). Characterisation of *Dichelobacter nodosus* and detection of *Fusobacterium necrophorum* and *Treponema* spp. in sheep with different clinical manifestations of footrot. *Veterinary Microbiology*, 179, 82–90. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.02.034>
- Frosth, S., Slette-meås, J. S., Jørgensen, H. J., Angen, Ø., Aspán, A. (2012). Development and comparison of a real-time PCR assay for detection of *Dichelobacter nodosus* with culturing and conventional PCR: Harmonisation between three laboratories. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 54(6), 1–7. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-54-6>
- Gelasakis, A. I., Kalogianni, A. I., Bossis, I. (2019). Aetiology, risk factors, diagnosis and control of foot-related lameness in dairy sheep. *Animals*, 9(8). <https://doi.org/10.3390/ani9080509>
- Ghimire, S. C., Egerton, J. R. (1996). Transmission of footrot in migratory sheep and goats of Nepal. *Small Ruminant Research*, 22(3), 231–240. [https://doi.org/10.1016/S0921-4488\(96\)00891-7](https://doi.org/10.1016/S0921-4488(96)00891-7)
- Ghimire, S. C., Egerton, J. R., Dhungyel, O. P. (1999). Transmission of virulent footrot between sheep and goats. *Australian Veterinary Journal*, 77, 450–453.

- Ghimire, S. C., Egerton, J. R., Dhungyel, O. P., Joshi, H. D. (1998). Identification and characterisation of serogroup M among Nepalese isolates of *Dichelobacter nodosus*, the transmitting agent of footrot in small ruminants. *Veterinary Microbiology*, 62, 217–233.
- Goddard, P., Waterhouse, T., Dwyer, C., Stott, A. (2006). The perception of the welfare of sheep in extensive systems. *Small Ruminant Research*, 62(3), 215–225. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.08.016>
- Graham, N. P. H., Egerton, J. R. (1968). Pathogenesis of ovine foot-rot: The role of some environmental factors. *Australian Veterinary Journal*, 44, 235–240. <https://doi.org/10.1002/9780813804545.ch3>
- Greber, D., Bearth, G., Lühinger, R., Schuepbach-regula, G., Steiner, A. (2016). Elimination of virulent strains (*aprV2*) of *Dichelobacter nodosus* from feet of 28 Swiss sheep flocks: A proof of concept study. *The Veterinary Journal*, 216, 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2016.06.015>
- Green, D. M., del Rio Vilas, V. J., Birch, C. P. D., Johnson, J., Kiss, I. Z., McCarthy, N. D., Kao, R. R. (2007a). Demographic risk factors for classical and atypical scrapie in Great Britain. *Journal of General Virology*, 88(12), 3486–3492. <https://doi.org/10.1099/vir.0.83225-0>
- Green, L. E., Wassink, G. J., Grogono-thomas, R., Moore, L. J., Medley, G. F. (2007b). Looking after the individual to reduce disease in the flock: A binomial mixed effects model investigating the impact of individual sheep management of footrot and interdigital dermatitis in a prospective longitudinal study on one farm. *Preventive Veterinary Medicine*, 78, 172–178. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2006.09.005>
- Green, L., Clifton, R. (2017). Diagnosing and managing footrot in sheep: an update. *In Practice*, 1–6. <https://doi.org/10.1136/inp.j4575>
- Green, L. E., George, T. R. N. (2008). Assessment of current knowledge of footrot in sheep with particular reference to *Dichelobacter nodosus* and implications for elimination or control strategies for sheep in Great Britain. *Veterinary Journal*, 175(2), 173–180. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.01.014>
- Grogono-Thomas, R., Johnston, A. M. (1997). *A study of ovine lameness*. Royal Veterinary College.
- Gurung, R. B., Dhungyel, O. P., Tshering, P., Egerton, J. R. (2006). The use of an autogenous *Dichelobacter nodosus* vaccine to eliminate clinical signs of virulent footrot in a sheep flock in Bhutan. *The Veterinary Journal*, 172, 356–363. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2005.04.032>
- Güven, A., Gundogdu, G., Vurucu, S., Uysal, B., Öztas, E., Öztürk, H., Korkmaz, A. (2009). Medical ozone therapy reduces oxidative stress and intestinal damage in an experimental model of necrotizing enterocolitis in neonatal rats. *Journal of Pediatric Surgery*, 44, 1730–1735. <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2009.01.007>

- Hengl, T., De Jesus, J. M., Heuvelink, G. B. M., Gonzalez, M. R., Kilibarda, M., Blagotić, A., Shangguan, W., Wright, M. N., Geng, X., Bauer-Marschallinger, B., Guevara, M. A., Vargas, R., MacMillan, R. A., Batjes, N. H., Leenaars, J. G. B., Ribeiro, E., Wheeler, I., Mantel, S., Kempen, B. (2017). SoilGrids250m: Global gridded soil information based on machine learning. In *PLoS ONE* (Vol. 12, Issue 2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169748>
- Hill, A. E., Dhungyel, O. P., Whittington, R. J. (2010). Diagnostic sampling strategies for virulent ovine footrot: Simulating detection of *Dichelobacter nodosus* serogroups for bivalent vaccine formulation. *Preventive Veterinary Medicine*, 95(1–2), 127–136. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2010.02.011>
- Hillerton, J. E., Irvine, C. R., Bryan, M. A., Scott, D., Merchant, S. C. (2017). Use of antimicrobials for animals in New Zealand, and in comparison with other countries. *New Zealand Veterinary Journal*, 65(2), 71–77. <https://doi.org/10.1080/00480169.2016.1171736>
- Hosie, B. (2004). Footrot and lameness in sheep. *Veterinary Record*, 154(2), 37–38.
- Hradilová, I., Duchoslav, M., Brus, J., Pechanec, V., Hýbl, M., Kopecký, P., Smržová, L., Štefelová, N., Vaclávek, T., Bariotakis, M., Machalová, J., Hron, K., Pirintsos, S., Smýkal, P. (2019). Variation in wild pea (*Pisum sativum* subsp. *elatius*) seed dormancy and its relationship to the environment and seed coat traits. *PeerJ*, 2019(1), 1–32. <https://doi.org/10.7717/peerj.6263>
- Hunt, J. D., Jackson, D. C., Brown, L. E., Wood, P. R., Stewart, D. J. (1994). Antigenic competition in a multivalent foot rot vaccine. *Vaccine*, 12(5), 457–464. [https://doi.org/10.1016/0264-410X\(94\)90125-2](https://doi.org/10.1016/0264-410X(94)90125-2)
- Hurtado, M. A., Píriz, S., Valle, J., Jimenez, R., Vadillo, S. (1998). Aetiology of ovine footrot in Spain. *Veterinary Record*, 142(3), 60–63. <https://doi.org/10.1136/vr.142.3.60>
- Instituto Nacional de Estatística. (2017). Anuário estatístico da Região Alentejo em 2016. *Instituto Nacional de Estatística, I.P.* Lisboa, Portugal.
- Instituto Nacional de Estatística. (2019). Anuário estatístico da Região Alentejo em 2018. *Instituto Nacional de Estatística, I.P.* Lisboa, Portugal.
- Jayasimhan, D., Wu, L., Huggan, P. (2017). Fusobacterial liver abscess: A case report and review of the literature. *BMC Infectious Diseases*, 17(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2548-9>
- Jiménez, R., Píriz, S., Martín-Palomino, P., Mateos, E., Vadillo, S. (2003). Aetiology of ovine footrot in the Portuguese region of Alto Alentejo. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 50(3), 118–120. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0450.2003.00645.x>
- Jordan, D., Plantt, W., Nicol, H. I., Jessep, T. M., Scrivener, C. J. (1996). Factors associated with the effectiveness of antibiotic treatment for ovine virulent footrot. *Australian Veterinary Journal*, 73(6), 211–215.

- Kaler, J. (2008). Epidemiological investigations into lameness in sheep. Veterinary sciences doctoral thesis at the University of Warwick, United Kingdom.
- Kaler, J., Green, L. E. (2006). Can farmers identify and name the most common foot lesions in sheep? *Proceedings of the 11th International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics*, 1–3.
- Kaler, J., Green, L. E. (2008). Naming and recognition of six foot lesions of sheep using written and pictorial information: A study of 809 English sheep farmers. *Preventive Veterinary Medicine*, *83*(1), 52–64.  
<https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2007.06.003>
- Kaler, J., Green, L. E. (2009). Farmers' practices and factors associated with the prevalence of all lameness and lameness attributed to interdigital dermatitis and footrot in sheep flocks in England in 2004. *Preventive Veterinary Medicine*, *92*(1–2), 52–59. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2009.08.001>
- Kaler, J., Medley, G. F., Grogono-Thomas, R., Wellington, E. M. H., Calvo-Bado, L. A., Wassink, G. J., King, E. M., Moore, L. J., Russell, C., Green, L. E. (2010). Factors associated with changes of state of foot conformation and lameness in a flock of sheep. *Preventive Veterinary Medicine*, *97*, 237–244.  
<https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2010.09.019>
- Kaler, J., Wani, S. A., Hussain, I., Beg, S. A., Makhdoomi, M., Kabli, Z. A., Green, L. E. (2012). A clinical trial comparing parenteral oxytetracycline and enrofloxacin on time to recovery in sheep lame with acute or chronic footrot in Kashmir, India. *BMC Veterinary Research*, *8*, 1–7. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-12>
- Kaplowitz, M. D., Lupi, F. (2004). Color photographs and mail survey response rates. *International Journal of Public Opinion Research*, *16*(2), 199–206.  
<https://doi.org/10.1093/ijpor/16.2.199>
- Katsogiannou, E., Athanasiou, L., Christodouloupoulos, G., Polizopoulou, Z. (2018). Diagnostic approach of anemia in ruminants. *Journal of Hellenic Veterinary Medical Society*, *69*(3), 1033–1046. <https://doi.org/10.12681/jhvms.18866>
- Kennan, R. M., Dhunghyel, O. M. P., Whittington, R. J., Egerton, J. R., Rood, J. I. (2001). The Type IV Fimbrial Subunit Gene (*fimA*) of *Dichelobacter nodosus* Is Essential for Virulence, Protease Secretion, and Natural Competence. *Journal of Bacteriology*, *183*(15), 4451–4458. <https://doi.org/10.1128/JB.183.15.4451>
- Kennan, R. M., Gilhuus, M., Frosth, S., Seemann, T., Dhunghyel, O. P., Whittington, R. J., Boyce, J. D., Powell, D. R., Aspán, A., Jørgensen, H. J., Bulach, D. M., Rood, J. I. (2014). the Ovine Footrot Pathogen *Dichelobacter nodosus*. *MBio*, *5*(5), 1–11.  
<https://doi.org/10.1128/mBio.01821-14>.Editor
- Kennan, R. M., Han, X., Porter, C. J., Rood, J. I. (2011). The pathogenesis of ovine footrot. *Veterinary Microbiology*, *153*(1–2), 59–66.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.04.005>

- Kennan, R. M., Wong, W., Dhungyel, O. P., Han, X., Wong, D., Parker, D., Rosado, C. J., Law, R. H. P., McGowan, S., Reeve, S. B., Levina, V., Powers, G. A., Pike, R. N., Bottomley, S. P., Ian Smith, A., Marsh, I., Whittington, R. J., Whisstock, J. C., Porter, C. J., Rood, J. I. (2010). The subtilisin-like protease *AprV2* is required for virulence and uses a novel disulphide-tethered exosite to bind substrates. *PLoS Pathogens*, 6(11), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001210>
- Kenyon, P. R., Maloney, S. K. Blache, D. (2014). Review of sheep body condition score in relation to production characteristics. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 57(1), 38-64. <https://doi.org/10.1080/00288233.2013.857698>
- König, U., Nyman, A. K. J., de Verdier, K. (2011). Prevalence of footrot in Swedish slaughter lambs. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 53(1), 1–5. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-53-27>
- Köppen, W. (1931). Grundriss der Klimakunde. *Walter de Gruyter*. Berlin, Germany. pp. 388.
- Kulldorff, M. (2001). Prospective Time Periodic Geographical Disease Surveillance Using a Scan Statistic. *Journal of Royal Statistical Society*, 164(1), 61–72.
- La Fontaine, S., Egerton, J. R., Rood, J. I. (1993). Detection of *Dichelobacter nodosus* using species-specific oligonucleotides as PCR primers. *Veterinary Microbiology*, 35(1–2), 101–117. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(93\)90119-R](https://doi.org/10.1016/0378-1135(93)90119-R)
- Lamont, B. B., He, T. (2017). When did a Mediterranean-type climate originate in southwestern Australia? *Global and Planetary Change*, 156, 46–58. <https://doi.org/10.1016/j.gloplacha.2017.08.004>
- Landau, S., Molle, G., Fois, N., Friedman, S., Barkai, D., Decandia, M., Cabiddu, A., Dvash, L., Sitzia, M. (2005). Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) as a novel pasture species for dairy sheep in the Mediterranean conditions of Sardinia and Israel. *Small Ruminant Research*, 59(2–3), 239–249. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.05.008>
- Landi, V., Lasagna, E., Ceccobelli, S., Martinez, A., Santos-Silva, F., Vega-Pla, J. L., Panella, F., Allain, D., Palhiere, I., Murawski, M., Dunner, S., Da Gama, L. T., Barba, C., Delgado, J. V., Sarti, F. M. (2019). An historical and biogeographical assessment of European Merino sheep breeds by microsatellite markers. *Small Ruminant Research*, 177(June), 76–81. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2019.06.018>
- Liu, D., Yong, W. K. (1993). Use of elastase test, gelatin gel test and electrophoretic zymogram to determine virulence of *Dichelobacter nodosus* isolated from ovine foot rot. *Research in Veterinary Science*, 55(1), 124–129. [https://doi.org/10.1016/0034-5288\(93\)90046-I](https://doi.org/10.1016/0034-5288(93)90046-I)
- Maboni, G., Blanchard, A., Frosth, S., Stewart, C., Emes, R., Töttemeyer, S. (2017). A distinct bacterial dysbiosis associated skin inflammation in ovine footrot. *Scientific Reports*, 7(December 2016), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep45220>
- Mann, C. J. (2003). Observational research methods. Research design II. *Emergency Medicine Journal*. 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.afjem.2011.12.004>

- Mchugh, N., MCGovern, F., Creighton, P., Pabiou, T., Mcdermott, K., Wall, E., Berry, D. P. (2018). Mean difference in live-weight per incremental difference in body condition score estimated in multiple sheep breeds and crossbreeds. *Animal*, 13(3), 549–553. <https://doi.org/10.1017/S1751731118002148>
- Mclaren, A., Conington, J., Lambe, N.L., Nieuwhof, G.J., Bishop, S.C., Bünger, L. (2008). Analysis of genetic relationships among footrot and performance data in Scottish Blackface sheep. *Proceedings of the British Society of Animal Science*. Scarborough, United Kingdom.
- McPherson, A. S., Dhungyel, O. P., Whittington, R. J. (2017). Evaluation of genotypic and phenotypic protease virulence tests for *Dichelobacter nodosus* infection in sheep. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(5), 1313–1326. <https://doi.org/10.1128/JCM.02403-16>
- McPherson, A. S., Dhungyel, O. P., Whittington, R. J. (2019). The microbiome of the footrot lesion in Merino sheep is characterized by a persistent bacterial dysbiosis. *Veterinary Microbiology*, 236, 108378. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.08.001>
- Mills, K., McClenaughan, P., Morton, A., Alley, D., Lievaart, J., Windsor, P. A., Egerton, J. R. (2012). Effect on time in quarantine of the choice of program for eradication of footrot from 196 sheep flocks in southern New South Wales. *Australian Veterinary Journal*, 90(1), 14–19. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2011.00872.x>
- Moynihan, E. L., Richards, K. G., Brennan, F. P., Tyrrel, S. F., Ritz, K. (2015). Enteropathogen survival in soil from different land-uses is predominantly regulated by microbial community composition. *Applied Soil Ecology*, 89, 76–84. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.01.011>
- Mucha, S., Bungler, L., Conington, J. (2015). Genome-wide association study of footrot in Texel sheep. *Genetics Selection Evolution*, 47, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12711-015-0119-3>
- Muzafar, M., Green, L. E., Calvo-Bado, L. A., Tichauer, E., King, H., James, P., Wellington, E. M. H. (2016). Survival of the ovine footrot pathogen *Dichelobacter nodosus* in different soils. *Anaerobe*, 38, 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.12.010>
- Myers, G. S. A., Parker, D., Al-Hasani, K., Kennan, R. M., Seemann, T., Ren, Q., Badger, J. H., Selengut, J. D., DeBoy, R. T., Tettelin, H., Boyce, J. D., McCarl, V. P., Han, X., Nelson, W. C., Madupu, R., Mohamoud, Y., Holley, T., Fedorova, N., Khouri, H., Paulsen, I. T. (2007). Genome sequence and identification of candidate vaccine antigens from the animal pathogen *Dichelobacter nodosus*. *Nature Biotechnology*, 25(5), 569–575. <https://doi.org/10.1038/nbt1302>
- Nagaraja, T. G., Narayanan, S. K., Stewart, G. C., Chengappa, M. M. (2005). *Fusobacterium necrophorum* infections in animals: Pathogenesis and pathogenic mechanisms. *Anaerobe*, 11(4), 239–246. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2005.01.007>

- Nieuwhof, G. J., Bishop, S. C. (2005). Costs of the major endemic diseases of sheep in Great Britain and the potential benefits of reduction in disease impact. *Animal Science*, 81(1), 23–29. <https://doi.org/10.1079/ASC41010023>
- Nieuwhof, G. J., Conington, J., Bungler, L., Haresign, W., Bishop, S. C. (2008). Genetic and phenotypic aspects of foot lesion scores in sheep of different breeds and ages. *Animal*, 2(9), 1289–1296. <https://doi.org/10.1017/S1751731108002577>
- Nieuwhof, Gert Jan, Conington, J., Bishop, S. C. (2009). A genetic epidemiological model to describe resistance to an endemic bacterial disease in livestock: Application to footrot in sheep. *Genetics Selection Evolution*, 41(19), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1297-9686-41-19>
- O'Hagan, J., McCabe, B. (1975). Tests for the Severity of Multicollinearity in Regression Analysis: A Comment. *The Review of Economics and Statistics*, 57(3), 368. <https://doi.org/10.2307/1923927>
- O'Kane, H., Ferguson, E., Kaler, J., Green, L. (2017). Associations between sheep farmer attitudes, beliefs, emotions and personality, and their barriers to uptake of best practice: The example of footrot. *Preventive Veterinary Medicine*, 139, 123–133. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2016.05.009>
- Olofsson, A., Bergsten, C., Averpil, H. (2005). Smittsam klövsjukdom hos får diagnostiserad för första gången i Sverige (Infectious claw disease diagnosed for the first time in Sweden). *Svensk Veterinärtidning*, 69(3), 1033–1046.
- Ozbay, I., Ital, I., Kucur, C., Akcilar, R., Deger, A., Aktas, S., Oghan, F. (2016). Effects of ozone therapy on facial nerve regeneration. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, 83, 168–175. <https://doi.org/10.1016/j.bjorl.2016.02.009>
- Ozgen, E. K., Cengiz, S., Ulucan, M., Okumus, Z., Kortel, A., Erdem, H., Sarac, H. G. (2015). Isolation and identification of *Dichelobacter nodosus* and *Fusobacterium necrophorum* using the polymerase chain reaction method in sheep with footrot. *Acta Veterinaria Brno*, 84, 97–104. <https://doi.org/10.2754/avb201584020097>
- Palmer, M. A. (1993). A gelatin test to detect activity and stability of proteases produced by *Dichelobacter (Bacteroides) nodosus*. *Veterinary Microbiology*, 36(1–2), 113–122. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(93\)90133-R](https://doi.org/10.1016/0378-1135(93)90133-R)
- Parsonson, I. M., Egerton, J. R., Roberts, D. S. (1967). Ovine interdigital dermatitis. *Journal of Comparative Pathology*, 77, 309–313.
- Pinto-Correia, T., Ribeiro, N., Potes, J. (2013). Livro Verde dos Montados. *Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas*, 61. <http://www.icaam.uevora.pt/Noticias-e-Informacoes/Temas-e-Eventos-Arquivo/Livro-Verde-dos-Montados>
- Pitman, D., Palmer, M., Depiazzi, L. (1994). The laboratory culture of *Dichelobacter nodosus* in a footrot eradication program. *Australian Veterinary Journal*, 71(4), 109–112.

- Prosser, N. S., Purdy, K. J., Green, L. E. (2019). Increase in the flock prevalence of lameness in ewes is associated with a reduction in farmers using evidence-based management of prompt treatment: A longitudinal observational study of 154 English sheep flocks 2013–2015. *Preventive Veterinary Medicine*, 173. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2019.104801>
- Raadsma, H. W., Egerton, J. R. (2013). A review of footrot in sheep: Aetiology, risk factors and control methods. *Livestock Science*, 156(1–3), 106–114. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2013.06.009>
- Ramilo, D. W., Nunes, T., Madeira, S., Boinas, F., Da Fonseca, I. P. (2017). Geographical distribution of *Culicoides* (Diptera: Ceratoponidae) in mainland Portugal: Presence/absence modelling of vector and potential vector species. *PLoS ONE*, 12(7), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180606>
- Ramos, Z., De Barbieri, I., van Lier, E., Montossi, F. (2018). Body and wool growth of lambs grazing on native pastures can be improved with energy and protein supplementation. *Small Ruminant Research*, 171, 92–98. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2018.11.009>
- Rendell, D. K., Callinan, A. P. L. (1997). Comparison of erythromycin and oxytetracycline for the treatment of virulent footrot in grazing sheep. *Australian Veterinary Journal*, 75(5), 354.
- Ribeiro, A. F. S., Russo, A., Gouveia, C. M., Pires, C. A. L. (2020). Drought-related hot summers: A joint probability analysis in the Iberian Peninsula. *Weather and Climate Extremes*, 30. <https://doi.org/10.1016/j.wace.2020.100279>
- Riffkin, M. C., Wang, L. F., Kortt, A. A., Stewart, D. J. (1995). A single amino-acid change between the antigenically different extracellular serine proteases V2 and B2 from *Dichelobacter nodosus*. *Gene*, 167, 279–283. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00664-8](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00664-8)
- Riordan, T. (2007). Human infection with *Fusobacterium necrophorum* (Necrobacillosis), with a focus on Lemierre's syndrome. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(4), 622–659. <https://doi.org/10.1128/CMR.00011-07>
- Roberts, D. S., Egerton, J. R. (1969). The aetiology and pathogenesis of ovine foot-rot. *Journal of Comparative Pathology*, 79, 217–227.
- Rocha, J., Carvalho-Santos, C., Diogo, P., Beça, P., Keizer, J. J., Nunes, J. P. (2020). Impacts of climate change on reservoir water availability, quality and irrigation needs in a water scarce Mediterranean region (southern Portugal). *Science of the Total Environment*, 736, 139477. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139477>
- Rosário, I. T., Rebelo, R., Cardoso, P., Segurado, P., Mendes, R. N., Santos-Reis, M. (2019). Can geocaching be an indicator of cultural ecosystem services? The case of the montado savannah-like landscape. *Ecological Indicators*, 99, 375–386. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2018.12.003>

- Saul, G. R., Russel, A. J. F., Sibbald, A. R. (1993). Potential of different sheep breeds to improve wool production on UK hill and upland sheep farms. *Small Ruminant Research*, 11(1), 1–9. [https://doi.org/10.1016/0921-4488\(93\)90112-U](https://doi.org/10.1016/0921-4488(93)90112-U)
- Schwartzkoff, C. L., Egerton, J. R., Stewart, D. J., Lehrbach, P. R., Elleman, T. C., Hoyne, P. A. (1993). The effects of antigenic competition on the efficacy of multivalent footrot vaccines. *Australian Veterinary Journal*, 70(4), 123–126. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1993.tb06101.x>
- Shelly, G. B., Rosenblatt, H. J. (2011) Chapter 4: Requirements Modelling. In: Shelly, G. B., Rosenblatt, H. J. (Eds.) *Systems Analysis and Design*. 9<sup>th</sup> Ed. Course Technology, Boston, United States. 140–197.
- Smith, E. M., Green, O. D. J., Calvo-Bado, L. A., Witcomb, L. A., Grogono-Thomas, R., Russell, C. L., Brown, J. C., Medley, G. F., KilBride, A. L., Wellington, E. M. H., Green, L. E. (2014). Dynamics and impact of footrot and climate on hoof horn length in 50 ewes from one farm over a period of 10 months. *Veterinary Journal*, 201(3), 295–301. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.05.021>
- Smith, M. G., Witte, M., Rocha, S., Basner, M. (2019). Effectiveness of incentives and follow-up on increasing survey response rates and participation in field studies. *BMC Medical Research Methodology*, 19(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12874-019-0868-8>
- Solano, L., Barkema, H. W., Mason, S., Pajor, E. A., LeBlanc, S. J., Orsel, K. (2016). Prevalence and distribution of foot lesions in dairy cattle in Alberta, Canada. *Journal of Dairy Science*, 99(8), 6828–6841. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-10941>
- Soutter, A. R. B., Möttus, R. (2020). “Global warming” versus “climate change”: A replication on the association between political self-identification, question wording, and environmental beliefs. *Journal of Environmental Psychology*, 69, 101413. <https://doi.org/10.1016/j.jenvp.2020.101413>
- Stäuble, A., Steiner, A., Frey, J., Kuhnert, P. (2014a). Simultaneous Detection and Discrimination of Virulent and Benign *Dichelobacter nodosus* in Sheep of Flocks Affected by Foot Rot and in Clinically Healthy Flocks by Competitive Real-Time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(4), 1228–1231. <https://doi.org/10.1128/JCM.03485-13>
- Stäuble, A., Steiner, A., Normand, L., Kuhnert, P., Frey, J. (2014b). Molecular genetic analysis of *Dichelobacter nodosus* proteases *AprV2/B2*, *AprV5/B5* and *BprV/B* in clinical material from European sheep flocks. *Veterinary Microbiology*, 168(1), 177–184. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.11.013>
- Stewart, D. J. (1979). The role of elastase in the differentiation of *Bacteroides nodosus* infections in sheep and cattle. *Research in Veterinary Science*, 27, 99–105.
- Stewart, D. J., Claxton, P. D. (1993). Ovine footrot: Clinical Isolation of new anaerobic bacteria from sheep hooves infected with footrot. *Veterinary Microbiology*, 139(3–4), 414–416

- Stewart, D. J., Peterson, J. E., Vaughan, J. A., Clark, B. L., Emery, D. L., Caldwell, J. B., Kortt, A. A. (1986). The pathogenicity and cultural characteristics of virulent, intermediate and benign strains of *Bacteroides nodosus* causing ovine foot-rot. *Australian Veterinary Journal*, 63(10), 317–326. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1986.tb02875.x>
- Strobel, H., Lauseker, M., Forbes, A. B. (2014). Targeted antibiotic treatment of lame sheep with footrot using either oxytetracycline or gamithromycin. *Veterinary Record*, 174, 1–5. <https://doi.org/10.1136/vr.101840>
- Sullivan, L. E., Clegg, S. R., Angell, J. W., Newbrook, K., Blowey, R. W., Carter, S. D., Bell, J., Duncan, J. S., Grove-White, D. H., Murray, R. D., Evans, N. J. (2015). High-level association of bovine digital dermatitis *Treponema spp.* with contagious ovine digital dermatitis lesions and presence of *Fusobacterium necrophorum* and *Dichelobacter nodosus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(5), 1628–1638. <https://doi.org/10.1128/JCM.00180-15>
- Surová, D., Pinto-Correia, T. (2016). A landscape menu to please them all: Relating users' preferences to land cover classes in the Mediterranean region of Alentejo, Southern Portugal. *Land Use Policy*, 54, 355–365. <https://doi.org/10.1016/j.landusepol.2016.02.026>
- Szponder, T., Wessely-Szponder, J., Świeca, M., Smolira, A., Gruszecki, T. (2017). The combined use of ozone therapy and autologous platelet-rich plasma as an alternative approach to foot rot treatment for sheep. A preliminary study. *Small Ruminant Research*, 156, 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2017.08.015>
- Tan, Z. L., Nagaraja, T. G., Chengappa, M. M. (1996). *Fusobacterium necrophorum* infections: virulence factors, pathogenic mechanism and control measures. *Veterinary Research Communications*, 20(2), 113–140. <https://doi.org/10.1007/BF00385634>
- Tanjung, L. R., Whittle, G., Shaw, B. E., Bloomfield, G. A., Katz, M. E., Cheetham, B. F. (2009). The intD mobile genetic element from *Dichelobacter nodosus*, the causative agent of ovine footrot, is associated with the benign phenotype. *Anaerobe*, 15(5), 219–224. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2009.02.005>
- Thorley, C. M. (1976). A Simplified Method for the Isolation of *Bacteroides nodosus* from Ovine Foot-rot and Studies on its Colony Morphology and Serology. *Journal of Applied Bacteriology*, 40, 301–309.
- Verbeek, M. (2014). *A Guide to Modern Econometrics*. 4th Ed. John Wiley & Sons Ltd. Chichester, United Kingdom. ISBN 978-1-119-95167-4
- Wani, S. A., Samanta, I. (2006). Current understanding of the aetiology and laboratory diagnosis of footrot. *Veterinary Journal*, 171(3), 421–428. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2005.02.017>
- Ware, J., Kluver, P. (2014). *Footrot Manual for Contractors*. University of Melbourne, Australia.

- Wassink, G. J., Grogono-Thomas, R., Moore, L. J., Green, L. E. (2003). Risk factors associated with the prevalence of footrot in sheep from 1999 to 2000. *Veterinary Record*, 152, 351–358.
- Wassink, G. J., George, T. R. N., Kaler, J., Green, L. E. (2010a). Footrot and interdigital dermatitis in sheep: Farmer satisfaction with current management, their ideal management and sources used to adopt new strategies. *Preventive Veterinary Medicine*, 96(1–2), 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2010.06.002>
- Wassink, G. J., King, E. M., Grogono-Thomas, R., Brown, J. C., Moore, L. J., Green, L. E. (2010b). A within farm clinical trial to compare two treatments (parenteral antibacterials and hoof trimming) for sheep lame with footrot. *Preventive Veterinary Medicine*, 96(1–2), 93–103. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2010.05.006>
- West, D. M. (1983). Observations on an outbreak of foot abscess in sheep. *New Zealand Veterinary Journal*, 31(5), 71–74. <https://doi.org/10.1080/00480169.1983.34973>
- Wilhelmi, M. H., Tiede, A., Teebken, O. E., Bisdas, T., Haverich, A., Mischke, R. (2012). Ovine blood: Establishment of a list of reference values relevant for blood coagulation in sheep. *ASAIO Journal*, 58(1), 79–82. <https://doi.org/10.1097/MAT.0b013e31823a5414>
- Winter, A. C. (2004). Lameness in sheep - Treatment and control. *In Practice*, 26(3), 130–139. <https://doi.org/10.1136/inpract.26.3.130>
- Winter, A. C. (2008). Lameness in sheep. *Small Ruminant Research*, 76(1–2), 149–153. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2007.12.008>
- Winter, A. C. (2009). Footrot control and eradication (elimination) strategies. *Small Ruminant Research*, 86, 90–93. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2009.09.026>
- Winter, A. C., Arsenos, G. (2009). Diagnosis of white line lesions in sheep. *In Practice*, 31(1), 17–21. <https://doi.org/10.1136/inpract.31.1.17>
- Winter, J. R., Green, L. E. (2017). Cost–benefit analysis of management practices for ewes lame with footrot. *Veterinary Journal*, 220, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2016.11.010>
- Winter, J. R., Kaler, J., Ferguson, E., Kilbride, A. L., Green, L. E. (2015). Changes in prevalence of, and risk factors for, lameness in random samples of English sheep flocks: 2004 – 2013. *Preventive Veterinary Medicine J*, 122, 121–128.
- Witcomb, L. A., Green, L. E., Calvo-Bado, L. A., Russell, C. L., Smith, E. M., Grogono-Thomas, R., Wellington, E. M. H. (2015). First study of pathogen load and localisation of ovine footrot using fluorescence in situ hybridisation (FISH). *Veterinary Microbiology*, 176(3–4), 321–327. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.01.022>

- Witcomb, L. A., Green, L. E., Kaler, J., Ul-Hassan, A., Calvo-Bado, L. A., Medley, G. F., Grogono-Thomas, R., Wellington, E. M. H. (2014). A longitudinal study of the role of *Dichelobacter nodosus* and *Fusobacterium necrophorum* load in initiation and severity of footrot in sheep. *Preventive Veterinary Medicine*, 115(1–2), 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2014.03.004>
- Witt, J., Green, L. (2018). Development and assessment of management practices in a flock-specific lameness control plan: A stepped-wedge trial on 44 English sheep flocks. *Preventive Veterinary Medicine*, 157, 125–133. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.06.013>
- Woolaston, R. R. (1993). Factors affecting the prevalence and severity of footrot in a merino flock selected for resistance to *Haemonchus contortus*. *Australian Veterinary Journal*, 70(10), 365–369. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1993.tb00809.x>
- Wreford, A., Topp, C. F. E. (2020). Impacts of climate change on livestock and possible adaptations: A case study of the United Kingdom. *Agricultural Systems*, 178, 102737. <https://doi.org/10.1016/j.agsy.2019.102737>
- Zhou, H., Hickford, J. G. H. (2000). Extensive diversity in New Zealand *Dichelobacter nodosus* strains from infected sheep and goats. *Veterinary Microbiology*, 71, 113–123.
- Zhou, Huitong, Bennett, G., Hickford, J. G. H. (2009a). Detection of *Fusobacterium equinum* on footrot infected hooves of sheep and cattle. *Veterinary Microbiology*, 134(3–4), 400–401. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.08.013>
- Zhou, Huitong, Bennett, G., Hickford, J. G. H. (2009b). Variation in *Fusobacterium necrophorum* strains present on the hooves of footrot infected sheep, goats and cattle. *Veterinary Microbiology*, 135(3–4), 363–367. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.084>
- Zhou, Huitong, Ennen, S., Ganter, M., Hickford, J. G. H. (2009c). Isolation of new anaerobic bacteria from sheep hooves infected with footrot. *Veterinary Microbiology*, 139(3–4), 414–416. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.06.009>
- Zingg, D., Steinbach, S., Kuhlitz, C., Rediger, M., Schüpbach-Regula, G., Aepli, M., Grøneng, G. M., Dürr, S. (2017). Epidemiological and economic evaluation of alternative on-farm management scenarios for ovine footrot in Switzerland. *Frontiers in Veterinary Science*, 4, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00070>

**Anexo 1 – *Inquérito de Validação* (aplicado aos produtores)**

# Projeto GEN-RES Alentejo

## Inquérito de Validação

**A1.** Nome: \_\_\_\_\_ **A2.** Marca Oficial: \_\_\_\_\_

**B1.** O efetivo ovino teve peira no ano 2016? Sim  Não

### Identificação de lesões podais

1. Relativamente às imagens (e respetiva legenda explicativa) em anexo e de acordo com a sua experiência, indique qual (ou quais) das seguintes lesões representa(m) casos clínicos de peira ovina (Identificar com **X** a(s) lesões que considera serem casos de peira).

Imagem	1	2	3	4	5	6	7	8
Lesões de peira	<input type="checkbox"/>							

2. Relativamente às imagens (e respetiva legenda explicativa) em anexo, indique qual (ou quais) das seguintes lesões podais já observou em ovinos na sua exploração (Identificar com **X** a(s) lesões que já observou).

Imagem	1	2	3	4	5	6	7	8
Lesões observadas	<input type="checkbox"/>							

Cofinanciado por:



**Anexo 2 – Compilação de imagens de lesões  
podais (anexo do *Inquérito de Validação*)**

## Imagem 0 (úngulas sem lesões)



Fonte: Ware & Kluver (2014)

### **Legenda:**

- Área interdigital ligeiramente rosada, seca e com camada de pelo.

## Imagem 1



Fonte: Raadsma & Egerton (2013)

### **Legenda:**

- Área interdigital apresenta-se húmida e com coloração rosada ou avermelhada
- Perda de pêlo no espaço interdigital
- Mau odor

## Imagem 2



Fonte: Raadsma & Egerton (2013)

### **Legenda:**

- Separação quase total entre a úngula e as estruturas subjacentes
- Grande extensão de tecido morto
- Secreção pastosa de coloração acinzentada com mau odor bastante intenso

## Imagem 3



Fonte: Davies (2011)

### **Legenda:**

- Alterações junto ao bordo coronário, que podem levar à separação total do casco
- Ausência de lesão na área interdigital

## Imagem 4



Fonte: Kaler (2008)

### **Legenda:**

- Crescimento exuberante (formato de morango) na extremidade da úngula
- Sangra bastante quando é manipulado

## Imagem 5



Fonte: Ware & Kluver (2014)

### **Legenda:**

- Lesão ocorre na área interdigital e na parte interna da úngula, que pode mesmo começar a separar-se das restantes estruturas
- Secreção pastosa de coloração acinzentada com mau odor bastante intenso

## Imagem 6



Fonte: Allan (2010)

### **Legenda:**

- Drenagem de material purulento pode ocorrer através da sola ou do bordo coronário
- Restantes estruturas e tecidos sem quaisquer alterações

## Imagem 7



Fotografia original

### **Legenda:**

- Área interdigital apresenta-se húmida e com uma coloração avermelhada bastante intensa
- Perda de pêlo na área interdigital
- Mau odor

## Imagem 8



Fonte: Winter & Arsenos (2009)

### **Legenda:**

- Pode iniciar-se a separação da úngula
- Aspeto de meia-lua na extremidade lateral das úngulas
- Ausência de lesão na área interdigital

**Anexo 3 – *Inquérito Epidemiológico* (aplicado aos produtores)**

# PROJECTO GEN-RES Alentejo

## INQUÉRITO EPIDEMIOLÓGICO

### A. DESCRIÇÃO DA EXPLORAÇÃO

A1. Nome

A2. Marca oficial

A3. Freguesia(s)

A4. Área total da exploração  ha

A5. Entre Outubro e Abril qual a área da exploração destinada aos animais  ha

#### RAÇAS DE OVINOS

- A6.  Linha pura (com inscrição em livro genealógico)
- Merina Branca
- Merina Preta
- Campaniça
- Outra

A7.  Cruzada

A8. N.º ovelhas adultas

A9. N.º de carneiros

#### ESPECIES COABITANTES

Identificação / N.º de Animais Considere o efetivo reprodutor

A10.  Caprinos

A11.  Bovinos

A12.  Suínos

A13.  Equinos

A14.  Outra Qual

A15. As diferentes espécies pastam nos mesmos locais?

Mesmo que não seja em simultâneo.

- Sim  Não  Alguns grupos

A16. Se sim, existe algum intervalo de tempo entre a saída de uma espécie e a entrada da seguinte?

Sim N.º de dias de intervalo

Não

A17. Há partilha de caminhos ou de pastagens com efetivos de outras explorações?

- Sim  Não

A18. Os animais de substituição são:

- Do próprio efetivo  Aquisição fora do efetivo

A19. Qual é a taxa de reposição aproximada do efetivo?

5%	10%	15%	20%	25%	30%
<input type="radio"/>					

A20. Há participação em feiras e mercados?

- Sim  Não

A21. ESTABULAÇÃO por favor indique os meses do ano em que os diferentes grupos de animais se encontram estabulados

	MESES											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Carneiros	<input type="checkbox"/>											
Ovelhas paridas	<input type="checkbox"/>											
Ovelhas gestantes	<input type="checkbox"/>											
Ovelhas alfeiras	<input type="checkbox"/>											

A22. COBRIÇÃO Indique os meses do ano em que ocorre

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<input type="checkbox"/>											

A.23. PARTOS Indique os meses do ano em que ocorrem

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<input type="checkbox"/>											

A24. PARTOS Indique o local onde ocorrem os partos

- Ovil
- Campo

Cofinanciado por:

# PROJECTO GEN-RES Alentejo

## INQUÉRITO EPIDEMIOLÓGICO

### ALIMENTAÇÃO

por favor, indique os alimentos fornecidos aos animais e os meses do ano

#### A25. Pastoreio direto

Meses	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Regadio	<input type="checkbox"/>											
Sequelro	<input type="checkbox"/>											

#### A26. Forragens conservadas e Palha

Meses	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Feno	<input type="checkbox"/>											
Desidratados	<input type="checkbox"/>											
Silagem	<input type="checkbox"/>											
Palha	<input type="checkbox"/>											

#### A27. Alimentos concentrados

Meses	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Ração	<input type="checkbox"/>											
Grãos de cereais	<input type="checkbox"/>											
Grãos de leguminosas	<input type="checkbox"/>											
Subprodutos	<input type="checkbox"/>											

#### A28. Os animais têm blocos de minerais à disposição?

Sim  Não

### SOLOS

#### A29. Textura Quantifique a textura do solo dos locais onde habitualmente se encontram os animais

Grosseira (pedregoso)	Intermédia (arenoso)	Fina (medianamente argiloso)	Muito Fina (muito argiloso)
1	2	3	4
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

#### A30. Considera que o tipo de pedras presentes nas zonas de pastoreio dos animais poderá provocar lesões nas unhas dos animais

Sim  Não

#### A31. Drenagem Qualifique a drenagem do solo dos locais onde habitualmente se encontram os animais

Bem drenados (não alagam com facilidade)	Alagam somente nos anos chuvosos	Alagam nos anos chuvosos e secos	Mal drenados (alagam com facilidade)
1	2	3	4
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

#### A32. ALTITUDE Os locais onde se encontram os animais são predominantemente:

Baixos (Várzeas)	Mela encosta	Várzea e Cerros	Altos (Cerros)
Várzea ou próximo da linha de água	Parte inferior da encosta	Mela encosta	Colina ou cumeada
1	2	3	4
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

#### A33. MONTADO os locais onde habitualmente se encontram os animais têm montado

Sim  Não  Nalguns locais

Cofinanciado por:

# PROJECTO GEN-RES Alentejo

## INQUÉRITO EPIDEMIOLÓGICO

### B. PEEIRA

B1. O efetivo ovino teve peeira no ano 2016?

Sim  Não

B2. Proporção de ovinos afetados no ano anterior:

	Residual (<10%)	Moderada (10% – 30%)	Grave (acima de 30%)
Animais de substituição	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Adultos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

B3. O efetivo caprino teve peeira no ano 2016?

Sim  Não  Não existe efetivo caprino

B4. Proporção de caprinos afetados no ano anterior:

	Residual (<10%)	Moderada (10% – 30%)	Grave (acima de 30%)
Animais de substituição	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Adultos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

B5. Sazonalidade das manifestações clínicas *por favor indique os meses do ano em que aparecem animais doentes*

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<input type="checkbox"/>											

B6. Prevenção e tratamento de animais

*por favor indique qual ou quais os procedimentos adotados atualmente na sua exploração*

- Pedilúvio
- Corte de unhas
- Tratamento tópico (com antisséptico ou desinfetante)
- Utilização de antibióticos sistémicos
- Separação dos animais afetados
- Vacinação
- Mudança periódica das camas
- Tratamento das camas (por exemplo com superfosfatos)
- Quarentena (a animais novos ou quando regressam de feiras)

### PEDILÚVIO

*Se na resposta B6 assinalou a opção "Pedilúvio" responda às seguintes questões*

B7 – Finalidade do pedilúvio

Profilática  Terapêutica  Ambas

B8 – Composição do pedilúvio:

Sulfato de cobre  Sulfato de Zinco

Outro

B9 – O número de compartimentos do pedilúvio é:

1  2  3

B10 – O comprimento do pedilúvio é de  cm

B11 – O piso do pedilúvio é:

Liso  Ondulado

B12 – A Localização do pedilúvio é:

Numa manga  À saída do ovil

### VACINA

*Se na resposta B6 assinalou a opção "Vacinação" responda às seguintes questões*

B13 – Qual a vacina que utiliza

FootVax  Vacina de rebanho

Outra Qual?

B13 – Há quantos anos vacina?  anos

B14 - Vacina todos os anos?

Sim  Não

B15 – Indique os meses em que costuma vacinar

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<input type="checkbox"/>											

Cofinanciado por:

## **Anexo 4 – Ficha de trabalho de campo**

Data: \_\_/\_\_/\_\_

Exploração: \_\_\_\_\_

Visita: \_\_\_\_

Folha: \_\_/ \_\_

Ordem	Nº SIA	Nº Casa	Sexo	Idade	Raça	Est. prod.	CC	Classificação Peeira				Biópsia?	Observações
								MAD	MAE	MPD	MPE		
1													
2													
3													
4													
5													
6													
7													
8													
9													
10													
12													
12													
13													
14													
15													
16													
17													
18													
19													
20													
21													
22													
23													
24													
25													