Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Ocorrência de Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR) em Bovinos Leiteiros em Portugal

Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Renata Sofia Pinto Castro

Orientador: Ana Cláudia Correia Coelho

Coorientador: Nuno Francisco Fonte-Santa Alegria

Vila Real, 2019

DECLARAÇÃO

NOME: Renata Sofia Pinto Castro

C.C.: 14958252

CORREIO ELECTRÓNICO: renata.sp.castro@gmail.com

DESIGNAÇÃO DO MESTRADO: Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA: Ocorrência de Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR) em Bovinos Leiteiros em Portugal

ORIENTADORA: Professora Doutora Ana Cláudia Correia Coelho

COORIENTADOR: Professor Doutor Nuno Francisco Fonte-Santa Alegria

ANO DE CONCLUSÃO: 2019

Declaro que esta dissertação de mestrado é resultado da minha pesquisa e trabalho pessoal e das orientações dos meus supervisores. O seu conteúdo é original e todas as fontes consultadas estão devidamente mencionadas no texto e na bibliografia final. Declaro ainda que este trabalho não foi apresentado em nenhuma outra instituição para obtenção de qualquer grau académico.

Vila Real, Maio de 2019

Renata Sofia Pinto Castro

Dedico

Aos meus pais,

Porto de abrigo, companheiros e maiores referências da minha vida.

Pela possibilidade da realização de um sonho.

Agradecimentos

Agradeço ao Magnífico Reitor da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro pelas facilidades concedidas na realização desta dissertação. Agradeço a todos os Docentes da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro que fizeram parte da minha formação pessoal e profissional.

À Professora Doutora Ana Cláudia, por aceitar ser a minha orientadora e por toda a sua ajuda, disponibilidade e amizade, não só nesta fase, mas em todo o meu percurso académico. Foi uma grande influência na minha vida académica, pela sua boa disposição e forma de ensinar, o que me levou a gostar bastante da área das doenças infecciosas.

Ao Professor Doutor Nuno Alegria, meu coorientador, não só pela sua ajuda e conhecimento partilhado ao longo da realização desta tese, mas também por me ter despertado um gosto especial pela virologia.

À Dra. Isabel Maia, médica veterinária da MPLVet®, por ser uma referência pela experiência que possui, pelos seus conhecimentos e ajuda durante o estágio. Um grande obrigado por todos os ensinamentos que me transmitiu, especialmente na área da reprodução, e acima de tudo, pela amizade.

Ao Dr. Mário Silveira, médico veterinário da UNICOL®, por todo o apoio e ajuda ao longo da minha estadia na ilha Terceira, e pelos conhecimentos que partilhou comigo ao longo do estágio.

A toda a restante equipa da UNICOL®: Dr. João Fagundes Dr. José Linhares, Dr. Pedro Garcia, Dra. Marlene Ribeiro pelas lições, companheirismo e dedicação na minha formação enquanto estagiária de medicina veterinária.

Aos meus grandes apoios e portos de abrigo, o meu pai Luís e a minha mãe Paula, por toda a dedicação que mostraram, não só ao longo do meu percurso académico, mas em toda a minha vida. Pela sua força e por nunca me deixarem desistir, pela sua amizade, carinho e exemplo que são na minha vida. Graças a eles, hoje sou uma mulher de princípios, forte e dedicada aos seus sonhos.

À minha irmã Francisca, por sempre me apoiar nos momentos mais difíceis e sempre me ensinar que para cada problema há uma solução.

Aos meus avós, Emília e José, por me acompanharem ao longo da minha vida e deste percurso académico, por me ensinarem valores importantes que me moldaram numa

pessoa melhor. Por sempre me darem um lugar calmo para estudar, com direito a lanche, e sempre me lembrarem que o mais importante é dar o meu melhor.

À minha família e amigos pelo interesse e apoio na minha formação pessoal e académica.

Ao Filipe, pela motivação e carinho que partilhou comigo ao longo deste trabalho.

Ao senhor Mário, pela amizade e companhia nos dias passados no seu café. Por fechar mais tarde para eu estudar nas alturas de exames e pelas gargalhadas partilhadas nos dias mais tranquilos.

A todos que de alguma forma participaram na minha vida e demonstraram apreço por mim.

A todos, muito obrigada!

Resumo

A rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) é uma doença causada pelo herpesvírus bovino tipo 1, responsável por elevados prejuízos económicos em efectivos leiteiros em todo o mundo, afectando a saúde e produtividade dos animais. A rinotraqueíte infecciosa bovina está presente em Portugal, ocorrendo habitualmente em prevalência elevada em adultos e média em vitelos. Assim, este estudo teve como objectivo determinar a ocorrência de IBR e analisar as variáveis associadas à ocorrência desta em algumas explorações leiteiras de Portugal.

Este trabalho foi realizado entre os meses de Agosto e Setembro de 2018 em Vila do Conde e Estarreja, e entre os meses de Novembro e Dezembro de 2018 na Ilha Terceira, recorrendo a um questionário epidemiológico e análise do histórico clínico das explorações.

Das 45 explorações de bovinos estudadas, 53,3% (n=24) foram consideradas positivas.

Quanto à localização das explorações positivas, 16,7% (n=4) pertenciam ao Concelho de Estarreja, 45,8% (n=11) pertenciam ao Concelho de Vila do Conde e 37,5% (n=9) pertenciam à Ilha Terceira nos Açores. Todas as explorações positivas do continente vacinavam os seus animais, ao contrário da Ilha Terceira, em que se verificou uma grande resistência, por parte dos produtores, à vacinação. Nesta região, das 9 explorações positivas no momento do estudo, 77,8% (n=7) não vacinavam os seus animais contra a doença.

Os resultados deste estudo mostram ser necessário, no futuro, uma abordagem mais aprofundada das variáveis estudadas, para que se compreenda de forma mais clara, como cada variável contribui para a doença, com vista a implementar medidas profiláticas e de maneio mais adequadas.

Palavras-chave: Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR), epidemiologia, ocorrência, bovinos leiteiros

Abstract

Infectious bovine rhinotracheitis (IBR) is a disease caused by bovine herpesvirus type 1, responsible for high economic damage on dairy herds around the world, affecting animal health and productivity. Infectious bovine rhinotracheitis is present in Portugal, occurring usually in high prevalence in adults and in calves. Thus, this study aimed to determine the occurrence of IBR and analyze the variables associated with the occurrence of this in some dairy farms in Portugal.

This work was carried out between August and September 2018 in Vila do Conde and Estarreja, and between November and December 2018 on Terceira Island, using an epidemiological questionnaire and analysis of the clinical history of the farms.

Of the 45 cattle farms studied, 53.3% (n = 24) were considered positive.

Regarding the location of the positive farms, 16.7% (n = 4) belonged to the Municipality of Estarreja, 45.8% (n = 11) belonged to Vila do Conde County and 37.5% (n = 9) belonged to Terceira Island in Azores. All the positive farms of the continent vaccinated their animals, unlike Terceira Island, where there was great resistance on the part of producers to vaccination. In this region, of the 9 positive farms at the time of the study, 77.8% (n = 7) did not vaccinate their animals against the disease.

The results of this study show that it is necessary in the future to take a deeper approach to the variables studied, in order to understand more clearly how each variable contributes to the disease, in order to implement more appropriate prophylactic and management measures.

Key words: Bovine Infectious Rhinotracheitis (IBR), epidemiology, occurrence, dairy cattle

Índice

Capítulo 1 1

1. Introdução 1

2. Etiologia 2

3. Epidemiologia 3

4. Patogenia 4

5. Sinais Clínicos 6

5.1 Complexo Respiratório Bovino 9

6. Diagnóstico 10

6.1 Diagnóstico Viral 10

6.2 Diagnóstico Serológico 12

7. Prognóstico e Terapêutica 13

8. Controlo e Prevenção 13

8.1 Vacinação 16

Capítulo 2 19

1. Objectivos 19

2. Material e Métodos 20

2.1 População 20

2.2 Questionário epidemiológico 21

2.3 Testes serológicos 21

2.4 Análise de dados 21

3. Resultados 22

3.1 Ocorrência da infeção por IBR em relação às medidas de biossegurança nas explorações 22

3.2 Ocorrência da infeção por IBR em relação ao maneio reprodutivo 24

3.3 Ocorrência da infeção por IBR em relação às características das instalações 24

3.4 Ocorrência da infeção por IBR em relação às práticas de maneio 25

3.5 Ocorrência da infeção por IBR em relação à sanidade 27

4. Discussão 28
5. Conclusão 36
Capítulo 3 37
Bibliografia 37
Anexos 43

Lista de Abreviaturas

BoHV-1 – Herpesvírus Bovino Tipo 1

BRSV – Vírus Respiratório Sincicial Bovino

BVD – Vírus da Diarreia Viral Bovina

CRB – Complexo Respiratório Bovino

gB – Glicoproteína B

gC – Glicoproteína C

gD – Glicoproteína D

gE – Glicoproteína E

gG – Glicoproteína G

gH – Glicoproteína H

gL – Glicoproteína L

IBR - Rinotraqueíte Infecciosa Bovina

IF – Imunoflurescência

IFN - Interferão

IPB – Balanopostite Pustular Infeciosa

IVP – Vulvovaginite Pustular Infecciosa

OIE – Organização Mundial da Saúde Animal

Pi3 – Vírus Parainfluenza

Capítulo 1

1. Introdução

A produção de leite é a principal e mais importante fonte de rendimento das explorações leiteiras, estando ligada a uma forte componente reprodutiva (Pasqualotto *et al.*, 2015). De forma a manter a rentabilidade de uma exploração é necessário ter em atenção diversos fatores, entre os quais se destacam o intervalo entre partos, o número de doses de sémen utilizadas na inseminação artificial, a taxa de conceção, a percentagem de mortes embrionárias, assim como de abortos (Viu *et al*., 2014). A redução da fertilidade no efetivo compromete seriamente a rentabilidade das explorações leiteiras (Pasqualotto *et al*., 2015). Entre as doenças que influenciam a performance e eficiência reprodutiva do efetivo, assim como, o estado de saúde geral dos animais, encontra-se a rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) (Viu *et al.*, 2014). Esta doença foi colocada na lista B pela Organização Mundial da Saúde Animal (OIE) devido ao seu impacto na saúde animal e economia das explorações (Pasqualotto *et al.*, 2015; OIE, 2018).

A rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) é causada pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1), que se pode manifestar de formas distintas, entre as quais se encontra a forma respiratória (rinotraqueíte infecciosa bovina) e a genital (vulvovaginite pustular infecciosa e balanopostite pustular infecciosa) (Médici *et al.*, 2000).

A infeção por este vírus contribui significativamente para a redução dos índices reprodutivos do efetivo, provocado sobretudo pela morte embrionária precoce e/ou tardia com repetição de cios, abortos entre o segundo e terceiro trimestre de gestação (Viu *et al.*, 2014), e nascimento de animais mortos ou fracos (Médici *et al.*, 2000). Pode--se ainda verificar, em alguns casos, encefalites e lesões no aparelho reprodutivo (Wentink *et al*., 1993). A nível respiratório, os sinais podem variar em gravidade, e nestes estão incluídos a tosse, o corrimento nasal e conjuntivite, podendo-se ainda desenvolver pneumonias bacterianas secundárias à infeção (Viu *et al.*, 2014).

A infeção de um animal por este agente é permanente pois, ao tratar-se de um herpesvírus, fica em latência no organismo do animal que passa a ser portador, e possível disseminador do vírus (Bezerra *et al.*, 2012).

2. Etiologia

A rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) e a vulvovaginite pustular infecciosa/balanopostite pustular infecciosa (IVP/IPB) são infeções que surgem em bovinos, causadas pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BoVH-1). O BoHV-1 é um Alfaherpesvirus pertencente ao género *Varicellovirus*, do qual se distinguem três genótipos diferentes: BoVH-1.1, BoVH-1.2a e BoVH-1.2b (Viu *et al.*, 2014).

O genoma viral é constituído por uma molécula de DNA de cadeia dupla, envolvido por uma capsíde icosaédrica, que é constituída por 162 capsómeros. Esta é coberta por um invólucro lipídico com glicoproteínas ancoradas (peplómeros) na sua superfície que possuem um papel fundamental na patogenia e imunidade, pela indução de resposta imunitária no hospedeiro (Ribeiro, 2010; Taylor *et al.*, 2013; Soares, 2017). As glicoproteínas virais medeiam a entrada do vírus nas células do hospedeiro, a sua fusão e a sua expansão célula-a-célula (Ribeiro, 2010)

De acordo com Franco & Roehe (2007), o genótipo BoHV-1.1 encontra-se associado a doença respiratória (IBR) e problemas reprodutivos, como infertilidade e abortos, sendo o mais virulento dos três genótipos. O BoHV-1.2a associa-se a várias manifestações clínicas, entre as quais, lesões no trato genital, correspondente a IPV e IPB, abortos e infeções do trato respiratório. Por sua vez, o BoHV-1.2b encontra-se associado a doença respiratória leve e IPV/IPB, não tendo sido até ao momento associado a abortos como acontece com os restantes genótipos.

Sendo um vírus com invólucro lipídico, é instável para valores baixos de pH e susceptível a determinados desinfectantes, embora seja relativamente estável no meio ambiente. A sua viabilidade vai depender de fatores como a temperatura, pH, luz e humidade. Este pode manter-se viável até um mês a uma temperatura de 4ºC, sendo rapidamente inativado a temperaturas mais elevadas. A uma temperatura de 56ºC o BoVH-1 é inativado em 21 minutos, a 37ºC em 10 dias e a 22ºC em 50 dias. Ambientes com elevada humidade também permitem que este vírus perdure durante mais tempo no meio ambiente, podendo manter-se viável até 30 dias em locais frios e com humidade acima dos 90%. Em locais mais quentes e menos húmidos, verificou-se que o BoVH-1 mantem-se ativo entre 5 e 13 dias. Quanto mais favoráveis forem as condições do meio, mais tempo este permanecerá ativo e capaz de causar infeção. Por fim, o vírus é sensível a substâncias desinfetantes que destruam o seu invólucro lipídico, como por exemplo,

derivados de fenol a 1%, compostos de amónio quaternário a 1%, hipoclorito de sódio a 2%, compostos iodados a 10% e solução de formalina a 5% (Wentink *et al.*, 1993; Ribeiro, 2010; Taylor *et al.*, 2013).

3. Epidemiologia

O herpesvírus bovino tipo 1 foi identificado pela primeira vez em 1956 nos Estados Unidos da América. Hoje sabe-se que este se encontra distribuído praticamente em todo o mundo, havendo apenas alguns países europeus, como a Finlândia, Dinamarca, Áustria, Suíça e Itália (Província de Bolzano), que conseguiram erradicar a doença. Outros países, como a Alemanha e a Bélgica, têm desenvolvido e implementado programas de controlo e erradicação através da vacinação dos efetivos, identificação e eliminação dos animais positivos (Nandi *et al.*, 2009; Bezerra *et al.*, 2012; Taylor *et al.*, 2013).

A transmissão do BoHV-1 ocorre através do contacto direto ou indireto entre animais, visto que o vírus é disseminado por secreções respiratórias, oculares e também secreções reprodutivas como o muco prepucial, vaginal ou sémen. Desta forma, a monta natural pode ser uma forma de transmissão direta entre animais (Raaperi *et al.*, 2014; Soares, 2017). No entanto, pensa-se que a forma mais frequente de transmissão será através de secreções respiratórias e oculares, especialmente em explorações intensivas ou semi-intensivas, onde a densidade e contacto entre animais é maior. Isto também se aplica em situações onde haja um grande agrupamento de animais, como leilões e exposições (Wentink *et al.*, 1993; Benoît *et al.*, 2007; Raaperi *et al.*, 2014).

A via transplacentária já foi indicada como sendo uma possível forma de transmissão do vírus da mãe para o feto, dependendo do estado imunitário desta aquando da infeção (Viu *et al*, 2014). Para além disso, há relatos de casos onde se identificou o vírus no leite, chamando a atenção para a possível transmissão do vírus através desta via (Franco & Roehe, 2007). A transmissão indireta pelo ar e fómites, assim como através da inseminação artificial, tem também um papel importante na entrada do vírus em explorações (Viu *et al.*, 2014). O sémen é contaminado no momento da ejaculação, através do contacto com a mucosa prepucial, e vários estudos indicam que este se mantém viável após a conservação por congelação (Takiuchi *et al.*, 2001). A partir do momento em que um animal é infectado permanecerá portador e constituirá uma fonte

de infeção para o resto da sua vida, levando à permanência e circulação do vírus dentro das explorações (Bezerra *et al.*, 2012). A vacinação permite diminuir a excreção, quer em quantidade quer em período de tempo, ou seja, o animal infectado mas vacinado excretará menor quantidade de partículas virais e durante um menor intervalo de tempo. Para além disso, confere um determinado grau de proteção aos animais saudáveis (Wentink *et al.*, 1993).

Todas as raças de bovinos e todos os animais, independente da idade, são susceptíveis de contrair infeção por BoHV-1. No entanto, há estudos que demonstram que bovinos acima dos 4 anos possuem um risco 2,4 vezes superior, comparativamente, a animais de outras faixas etárias. Nestes estudos também se demostrou uma maior ocorrência da doença em animais com mais de seis meses, observando-se elevadas taxas de incidência em animais com idades mais avançadas, o que se pode dever ao declínio da imunidade materna (Ferreira, 2009; Nandi *et al.*, 2009; Ribeiro, 2010; Raaperi *et al.*, 2014). Isto pode dever-se ao facto de animais mais velhos estarem submetidos a um ambiente de maior stresse, quer devido à sua movimentação e exigência produtiva, como também à sua maior exposição a fatores de riscos como, por exemplo, o contacto com animais infectados (Bezerra *et al.*, 2012). Por outro lado, há estudos que demonstram que o sexo dos animais pode ser um risco, sendo que os machos são frequentemente mais positivos que as fêmeas (Benoît *et al.*, 2007; Raaperi *et al.*, 2014).

4. Patogenia

A infeção viral ocorre por contacto do vírus com as mucosas, através de aerossóis, fómites ou contacto direto com secreções nasais, oculares ou genitais. Após a infeção inicial, ocorre uma resposta febril nos dois a três dias seguintes (Tikoo *et al.*, 1996). No caso da infeção do trato respiratório, a multiplicação viral origina rinite, laringite e traqueíte, levando à perda de vilosidades dos epitélios traqueais e favorecendo o aparecimento de infeções secundárias. A infeção respiratória pode disseminar-se através do ducto lacrimal, atingindo a mucosa ocular, levando ao aparecimento de conjuntivite. Podem-se ainda observar áreas de necrose focal na mucosa nasal, que se apresentam como placas brancas, normalmente acompanhadas por secreções nasais e oculares, que resultam da lise celular provocada pela replicação do vírus. Através do nervo trigémeo, o vírus pode ainda infectar os tecidos cerebrais, dando origem a meningoencefalite

(Straub, 1991; Taylor *et al.*, 2013). Actualmente, sabe-se que muitos dos casos relatados de meningoencefalites correspondem ao herpesvírus bovino tipo 5, que durante muitos anos foi considerado um subtipo do BoHV-1, devido ao elevado grau de semelhança entre os seus genomas e reacções cruzadas nos testes serológicos (Oliveira *et al.*, 1998; Souza *et al.*, 2002).

Devido à possível replicação do vírus no trato digestivo, este pode também provocar enterites e, em fêmeas gestantes, originar alterações na placenta e feto, resultando em aborto (Jones, 2010; Taylor *et al.*, 2013; Hou *et al.*, 2017).

A severidade dos sinais clínicos vai depender da estirpe viral, da dose infectante, da via de infeção e fatores ambientais, assim como, do estado imunitário do animal e suas características individuais, como por exemplo, a idade. O estado do animal pode-se agravar caso ocorram infeções bacterianas secundárias (Soares, 2017).

Segundo Nandi *et al.* (2009), a viremia pelo herpesvírus bovino tipo 1 já foi demonstrada experimentalmente. *In vitro*, os investigadores demonstraram que o vírus conseguia infectar monócitos no sangue, vendo que, no entanto, a sua replicação e libertação eram limitadas. Para além disso, concluíram ainda que os linfócitos poderiam servir de veículo de transporte do vírus pelo organismo, desde que não estivessem presentes anticorpos neutralizantes.

Durante a replicação no local de entrada do vírus, este pode atingir os axónios das células nervosas locais e, por transporte intra-axonal, atingir os corpos de neurónios nos gânglios regionais, onde permanece em latência (Benoît *et al.*, 2007). Infeções respiratórias e oculares levam à latência do vírus em neurónios sensoriais do gânglio trigémeo. Por outro lado, infeções genitais levam à latência nos gânglios sacrais (Benoît *et al.*, 2007; Nandi *et al.*, 2009). Existe ainda a possibilidade do vírus se manter em latência nas amígdalas faríngeas, fora do sistema nervoso (Benoît *et al.*, 2007). O vírus latente produz proteínas que protegem as células onde se encontram evitando a apoptose (Nandi *et al.*, 2009; Jones, 2010; Workman *et al.*, 2018). A vacinação de animais infectados não confere protecção contra o estabelecimento de latência do vírus de campo (Taylor *et al.*, 2013).

A entrada do vírus nas células é um processo complexo, composto por diversas etapas, envolvendo várias glicoproteínas e, pelo menos, dois recetores celulares. A glicoproteína C (gC) inicia todo este processo através da sua ligação ao sulfato de heparano, que é um proteoglicano presente na superfície celular. Este composto encontra-se em muitas células do organismo, o que permite ao BoHV-1 infectar uma

grande variedade de células. Esta ligação origina um acessório solto que é seguido por uma ligação da glicoproteína D (gD) ao segundo recetor celular. Este processo é essencial para dar início à entrada do vírus na célula e para a realização das etapas que levam à fusão do envelope viral com a membrana celular. Esta fusão é mediada por uma serie de interações entre as glicoproteínas B (gB), H (gH) e L (gL) (Nandi *et al.*, 2009).
Posteriormente à fusão, este é transportado para o núcleo da célula, onde se inicia uma série de processos que originam a replicação do vírus e saída deste das células, quer através da ruptura ou fusão destas, levando à disseminação do vírus, célula a célula (Tikoo *et al.*, 1996).
A seguir à infecção há, por parte do hospedeiro, uma resposta não específica (inata), mediada por neutrófilos, macrófagos, complemento, entre outros. Esta é a primeira resposta à infecção, seguida de uma resposta específica (adaptativa), através da qual o organismo cria memória imunológica, o que lhe permite responder de forma mais eficaz perante novas infecções pelo mesmo agente. Esta resposta é medida por linfócitos T e linfócitos B. Estes, juntamente com os anticorpos neutralizantes, impedem a disseminação do vírus pelo organismo, previnem infecções secundárias e limitam os sinais clínicos após reactivação viral (Babiuk *et al.*, 1996; Tikoo *et al.*, 1996; Benoît *et al.*, 2007).
Após a recuperação do animal, o BoHV-1 permanece em latência no seu organismo, que passa a ser portador para o resto da vida. O vírus pode ser reativado através de estímulos externos, como situações de stresse, originadas pelo transporte, alterações climáticas, desmame, entre outras, e imunodepressão, provocada pelo uso de glucocorticoides, por exemplo. Ao ser reativado, ocorrerá novamente replicação viral, havendo excreção deste e, possível transmissão a outros animais, levando à perpetuação do agente na exploração (Tikoo *et al.*, 1996; Meyer *et al.*, 2001; Workman *et al.*, 2018).
Os sinais clínicos após reativação do vírus geralmente são menos notórios ou mesmo inexistentes, quando comparados com os sinais originados pela infeção primária (Soares, 2017).

5. Sinais Clínicos

A infeção pelo herpesvírus bovino tipo 1 pode apresentar-se de forma subclínica ou clínica, mais ou menos grave, dependendo de vários fatores referidos anteriormente. As

manifestações clínicas da infeção vão depender sobretudo da via de infeção e da estirpe envolvida, podendo levar a alterações respiratórias, oculares, genitais e ainda alterações a nível dos tecidos cerebrais, como encefalites (Ribeiro, 2010).

A infeção respiratória, tal como a ocular, que podem surgir simultaneamente, são as formas mais comuns da doença, especialmente em sistemas de criação de bovinos intensivos. Após infeção, o animal desenvolve febre (41ºC), depressão e inapetência. A nível respiratório o animal pode apresentar dispneia acompanhada de tosse em alguns casos, com descargas nasais serosas que podem evoluir para mucopurulentas, caso ocorram infeções bacterianas secundárias. As mucosas apresentam-se hiperémicas e o possui muitas vezes salivação excessiva. É frequente observarem-se lesões vesiculares que podem evoluir para erosivas e ulcerativas, devido à replicação do vírus no local de entrada. Muitas vezes estas lesões são posteriormente recobertas por membranas fibrinosas, dando origem a placas diftéricas brancas ou amareladas nas narinas, muito característica desta doença. A infeção respiratória pode evoluir para ocular através dos ductos lacrimais, ou esta pode surgir isoladamente, levando a conjuntivite, lacrimejamento e corrimento ocular seroso/mucopurulento. Em algumas circunstâncias, a conjuntivite pode surgir como única manifestação clínica da infeção (Franco & Roehe, 2007; Nandi *et al.*, 2009).

Nos efetivos de produção de leite há uma quebra acentuada da produção de leite nos animais infectados pela primeira vez, algo que não acontece nas subsequentes reactivações virais (Ribeiro, 2010; Ring *et al.*, 2018).

A infeção genital surge associada a hiperemia, edema e tumefação da região genital (vulva ou pénis), assim como, vesículas, pústulas e/ou úlceras que levam ao desconforto do animal e, em efetivos que realizem a monta natural, esse desconforto e dor pode levar à recusa de monta por parte do animal. Podem ainda verificar-se corrimentos e aumento da micção, apresentando por vezes, os animais, a cauda levantada e flexionada lateralmente. As lesões ulcerativas são frequentemente recobertas por membranas fibrinosas de coloração branco-amarelada. As alterações na fertilidade do touro vão depender da gravidade da infeção, mas em casos não complicados, a líbido e qualidade do sémen não são afetadas (Franco & Roehe, 2007; Taylor *et al.*, 2013; Viu *et al.*, 2014).

A manifestação nervosa da infeção surge sobretudo em animais jovens, através do transporte intra-axonal do vírus ate aos tecidos cerebrais, originando anorexia, tremores

intermitentes, ataxia, “circling” e depressão. Os animais entram em coma e morrem, geralmente, num periodo de 4 dias (Nandi *et al.*, 2009).

A infeção de neonatos não é frequente, provavelmente devida à proteção obtida pela ingestão de colostro (Benoît *et al.*, 2007). No entanto, quando estes animais são infectados precocemente, há uma maior mortalidade, principalmente pelo desenvolvimento de pneumonia por aspiração causada por edema traqueal (Ribeiro, 2010). Para além dos sinais descritos anteriormente, estes animais apresentam muitas vezes diarreia esbranquiçada e úlceras em diversos órgãos do aparelho digestivo. As infeções bacterianas secundárias deteorizam ainda mais o estado de saúde do animal, aumentando a mortalidade (Benoît *et al.*, 2007).

O aborto em animais gestantes é uma consequência da disseminação sistémica do vírus, normalmente, associada a infeções respiratórias e/ou oculares (Nandi *et al.*, 2009; Ribeiro, 2010). Este atinge o feto através dos vasos placentários, levando à morte do feto num período de 24-48 horas. A morte fetal ocorre antes da degeneração da placenta, daí haver um atraso na sua expulsão, resultando na autólise do feto dentro do útero e retenção placentária na maioria dos casos (Newcomer, 2016; Sibhat *et al.*, 2018). Caso a infeção embrionária ou fetal ocorra nos primeiros dois trimestres da gestação, a morte embrionária/fetal é acompanhada de um cio precoce ou aborto. O feto é sensível ao agente em todo o período do seu desenvolvimento, no entanto, a maioria dos abortos ocorre entre o 5º e 8º mês de gestação. A infeção neste período pode originar, para além dos abortos, mumificações, nados-mortos ou pouca viabilidade nos recém-nascidos, com peso corporal abaixo do ideal (Newcomer, 2016; Asmare *et al.*, 2018). A análise dos fetos e anexos fetais, através de testes imunohistoquímicos ou técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR), permitem distinguir os vários agentes patogénicos que conduzem a abortos nos bovinos. O estabelecimento da etiologia é fundamental para que sejam implementados, posteriormente, medidas para o controlo e erradicação do agente e para a prevenção de novos casos de doença (Franco & Roehe, 2007; Ribeiro, 2010; Taylor *et al.*, 2013).

Em todas as formas de infeção podem surgir infeções bacterianas secundárias que complicam o quadro clínico (Ring *et al.*, 2018). Após as lesões provocadas pelo vírus, podem-se desenvolver tecidos cicatriciais que vão originar aderências, constrições e estenoses, por exemplo, no aparelho reprodutor da fêmea e do macho, podendo levar a deformação do pénis. Na fêmea podem surgir ooforites, que causam inflamação e destruição do corpo lúteo levando a perda e reabsorção do embrião, metrites e

endometrites. Desta forma há um comprometimento da eficiência reprodutiva, com o aumento do intervalo entre partos, diminuição da taxa de conceção, aumento da taxa de mortalidade embrionária e percentagem de abortos (Ribeiro, 2010; Asmare *et al.*, 2018; Sibhat *et al.*, 2018)**.**

5.1 Complexo Respiratório Bovino

Os principais agentes patogénicos envolvidos no complexo respiratório bovino (CRB) são o herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1), o vírus parainfluenza (Pi3), o vírus respiratório sincicial bovino (BRSV) e o vírus da diarreia viral bovina (BVD). Estes agentes, juntamente com bactérias da microbiota normal do trato respiratório capazes de se tornarem oportunistas, como *Mannheimia haemolytica, Mycoplasma bovis, Pasteurella multocida* e *Histophilus somni,* causam a chamada febre dos transportes ou CRB (Xue *et al.*, 2010; Grissett *et al.*, 2015), resultando destas diversas lesões para o animal, como a destruição do epitélio ciliado do aparelho respiratório e ineficácia da limpeza pelo muco naturalmente presente (Xue *et al.*, 2010; Earley *et al.*, 2017).

O herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) também pode iniciar o complexo respiratório bovino através da depressão do sistema imunitário, favorecendo a colonização pelas bactérias referidas, provocando infeções secundárias que podem originar pneumonias e morte do animal (Jones, 2010; Grissett *et al.*, 2015; Earley *et al.*, 2017). O BoHV-1 codifica pelo menos três tipos de proteínas capazes de causarem imunodepressão, que se denominam por proteína blCP0, glicoproteína G e UL49.5. A proteína blCP0 ativa a expressão dos genes virais e inibe a transcrição celular dependente do interferão (IFN). A glicoproteína G (gG) é produzida e excretada pelas células infectadas, ligando-se a vários tipos de quimiocinas, que são responsáveis pela regulação das funções dos leucócitos, assim como dos reguladores da inflamação e vigilância imunitária. A interação entre as gG e as quimiocinas vai levar ao bloqueio das suas funções, e assim diminuir a eficiência do sistema imunitário. Para além disso, a infeção pelo BoHV-1 vai levar à expressão de citocinas que aumentam o efeito prejudicial da leucotoxina produzida pela bactéria *Mannheimia haemolytica,* amplificando assim a gravidade das lesões pulmonares (Jones, 2010). As citocinas aumentam ainda a permeabilidade vascular, coagulação, fibrinólise e dano tissular (Tikoo *et al.*, 1996). A chamada de neutrófilos para o local de infeção, a sua acumulação e possível rutura e desgranulação

leva à libertação de substâncias que são tóxicas e danosas para o tecido pulmonar, agravando assim as lesões já existentes (Earley *et al.*, 2017). Por fim, este vírus consegue ainda infectar linfócitos T, causando a sua apoptose (Jones, 2010).

6. Diagnóstico

O diagnóstico de uma possível infeção pelo herpesvírus bovino tipo 1 pode ser feito com base no histórico do efetivo, sinais clínicos e lesões apresentadas pelos animais. No entanto, este é um diagnóstico presuntivo, pois são vários os agentes infecciosos e não infecciosos que podem originar manifestações clínicas semelhantes (Takiuchi *et al.*, 2001). Para confirmar a etiologia das alterações no efetivo é necessário a realização de exames laboratoriais, nos quais se utilizam amostras de secreções nasais, oculares ou genitais, assim como amostras de tecidos, por exemplo, em caso de aborto ou morte do animal. Para além disso, pode-se ainda utilizar sangue para a realização de exames serológicos (Ferreira, 2009; Hou *et al.*, 2017; Muratore *et al.*, 2017).

6.1 Diagnóstico Viral

A imunofluorescência permite a observação de antigénios em tecidos ou suspensões celulares, através da ligação de anticorpos conjugados com marcador fluorescente ao antigénio presente na amostra (OIE, 2018). Para tal, é necessário que as partículas virais mantenham a sua integridade estrutural e seja realizado um esfregaço celular com elevado número de células, adequado para a leitura da lâmina (Takiuchi *et al.*, 2001). No entanto, há que ter em conta as condições de transporte e armazenamento, pois facilmente as partículas virais perdem a sua integridade, quer por autólise dos tecidos quer por contaminação bacteriana. As amostras devem ser utilizadas num prazo de 3 dias, para que seja obtido um resultado válido e fiável (Takiuchi *et al.*, 2001).

Recorrendo ao mesmo material utilizado na IF, pode-se tentar o isolamento viral em culturas celulares (Del Fava *et al.*, 2002). O BoHV-1 provoca um efeito citopático bastante evidente em diversos tipos de células, podendo este efeito ser observado 24 a 72 horas após a inoculação (Franco & Roehe, 2007). Este efeito é caracterizado por aglomerados de células arredondadas presentes em torno de uma microplaca na cultura celular, podendo as células apresentar vacuolização e inclusões. Caso não se verifique

este efeito após 7 dias, deve ser realizada uma nova passagem do sobrenadante pela cultura. Após 3 passagens em que não se observe este efeito, pode-se concluir que a amostra é negativa. Esta técnica, além de ser bastante laboriosa, tem um elevado custo e é morosa, visto que os resultados podem demorar 14 a 28 dias (Takiuchi *et al.*, 2001; Franco & Roehe, 2007; Newcomer, 2016; Walz *et al.*, 2017). Para além disso, em casos de aborto em que o feto já possui algum grau de autólise, esta técnica não é a mais indicada, pois é necessário que o vírus se mantenha viável para o isolamento em cultura, devendo nestes casos, a opção ser a PCR (Mahajan *et al.*, 2013). Quando se observa o efeito citopático, a presença deste agente deve ser sempre confirmada, por exemplo, através de IF ou imunohistoquímica, pois existem outros agentes que provocam este efeito, como por exemplo, o BoHV-5 (Franco & Roehe, 2007). Caso se pretendam realizar culturas celulares a partir do sémen são necessários cuidados especiais, visto que este possui fatores inibitórios da replicação viral (Ferreira, 2009).

A reação em cadeia da polimerase, também denominada por PCR, permite a amplificação de uma região específica do DNA viral para identificação do agente patogénico (OIE, 2018). É uma técnica com alta especificidade e sensibilidade, rápida e eficaz, podendo ser realizada em algumas horas (Mahajan *et al.*, 2013; Walz *et al.*, 2017). Ao contrário das técnicas anteriores, esta pode ser utilizada em casos em que o vírus se encontra em latência no organismo do animal ou em tecidos/secreções em que este já não possua capacidade infectante ou esteja apenas presente num número reduzido de células. A PCR em tempo real requer uma menor manipulação, reduzindo o risco de contaminação, e é mais rápida, podendo os resultados ser obtidos em poucas horas e, possui elevada especificidade e sensibilidade (OIE, 2018). Para além disso, ao ser utilizada em amostras de sémen, permite obter um diagnóstico 4 dias após a infeção, mesmo antes de existir anticorpos neutralizantes detetáveis no sangue (Takiuchi *et al.*, 2001; Sarangi *et al.*, 2018). Em comparação com as técnicas descritas anteriormente, a PCR é considerada uma técnica mais adequada e eficaz para o diagnóstico de BoHV-1, sobretudo porque não é afetada pela autólise do feto e placenta, caso sejam utilizadas amostras destes para o diagnóstico (Mahajan *et al.*, 2013).

6.2 Diagnóstico Serológico

Os testes serológicos permitem identificar tanto infeções activas como em estado de latência, sendo por isso uma forma útil e fiável de obter um diagnóstico conclusivo e determinar a presença do agente no efetivo bovino. Os testes para detecção de anticorpos contra o herpesvírus bovino tipo 1, permitem determinar a prevalência da infeção em estudos epidemiológicos, identificar animais infectados que se pretenda importar/exportar e são ainda uma ferramenta de grande utilidade em programas de erradicação (OIE, 1992; Soares, 2017; OIE, 2018).

Os testes serológicos mais utilizados são a soro-neutralização e o teste ELISA. Este último é um teste imunoenzimático que permite a identificação de anticorpos específicos no soro sanguíneo, havendo diversas variantes, como o método de ELISA direto, indireto, de competição ou de bloqueio. O ELISA de bloqueio para detecção de anticorpos contra a gE é muito útil em efetivos que usem a vacina "marcada" (Mahajan *et al.*, 2013; OIE, 2018).

A soro-neutralização consiste na detecção de anticorpos capazes de neutralizar a ação do vírus numa cultura de células. Estima-se que possua uma sensibilidade de 89,2% e uma especificidade de quase 100% (Ferreira, 2009). É uma técnica laboriosa e de menor sensibilidade quando comparado com o teste ELISA. O ELISA é bastante utilizado para o diagnóstico serológico de várias doenças, incluindo a rinotraqueíte infecciosa bovina. Através dele é possível a detecção de anticorpos 7 dias após a infeção. Os métodos ELISA indiretos e ELISA gB não permitem a distinção entre animais infectados ou não infectados. Neste momento, segundo a OIE, o único teste marcado que se encontra disponível corresponde ao ELISA de bloqueio para detecção de anticorpos anti-gE BoHV-1, que permite a distinção entre animais infectados e vacinados com vacinas "marcadas" (Goolaerts *et al.*, 2017). Em geral, os diferentes testes de ELISA possuem elevada sensibilidade analítica, detectando quantidades muito pequenas de anticorpos. Para a análise de um elevado número de amostras e diagnóstico sorológico da IBR, o ELISA é considerado o teste ideal devido à simplicidade de execução, rapidez, fiabilidade e custo baixo, quando comparado com outros testes (Mahajan *et al.*, 2013). No entanto, a sua especificidade pode variar consoante o tipo de teste utilizado, sendo por isso necessário escolher o mais adequado a cada caso (Ribeiro, 2010; Raaperi *et al.*, 2014).

Para além da sua utilização em amostras de soro sanguíneo, o ELISA pode ainda ser utilizado em amostras de leite individuais ou do tanque de leite da exploração. É uma forma prática e rápida de obter informações sobre o estado sanitário do efetivo a baixo custo tendo, no entanto, as suas limitações. Um dos pontos críticos a apontar é a baixa sensibilidade deste teste quando realizado no leite do tanque de ordenha, devido à diluição do leite positivo de vacas infectadas no leite de vacas não infectadas, e devido à baixa concentração de anticorpos normalmente presentes no leite (Goolaerts *et al.*, 2017). Um teste ELISA positivo para gB, que representa o teste ELISA mais sensível, pode indicar se a infeção já se disseminou ou não pelo efetivo bovino. No entanto, o teste ELISA de bloqueio de gE só apresenta resultados positivos quando a infeção atinge mais de 10% a 15% do efetivo, não sendo por isso adequado para classificar uma exploração como livre de IBR (Ribeiro, 2010). Para além disso, é importante referir que nem todos os animais da exploração estarão lactantes no momento do teste, havendo assim, animais que podem estar infectados e não serão detectados (Goolaerts *et al.*, 2017).

7. Prognóstico e Terapêutica

O prognóstico é favorável na maioria dos casos, mas quando ocorrem infeções bacterianas secundárias, por vezes graves, o estado clínico do animal pode rapidamente deteriorar-se. O IBR causa baixa mortalidade mas elevada morbilidade. O tratamento é sintomático, e a infeção pelo BoHV-1 é para toda a vida do animal. As infeções bacterianas secundárias podem ser controladas com o uso de antibióticos de largo espectro. Também se aconselha o uso de anti-inflamatórios, antipiréticos e mucolíticos no caso de infeções respiratórias. No caso de lesões genitais, podem ser utilizados antissépticos como a clorexidina ou iodóforos, e ainda soluções antibióticas localmente (Viu *et al.*, 2014).

8. Controlo e Prevenção

Independentemente da área geográfica que se pretenda analisar, é importante definir a distribuição e prevalência da infeção, de forma a definir planos de controlo e erradicação adaptados a cada situação (Maresca *et al.*, 2018). Isto porque, numa área

com grande distribuição e elevada prevalência, os métodos de controlo convencionais, de testagem e abate dos animais positivos podem acarretar um grande investimento financeiro. Nestes casos, o controlo e prevenção devem basear-se no aumento da imunidade do efetivo através do uso de vacinas e medidas que evitem a entrada de animais positivos (Ackermann & Engels, 2006; Sibhat *et al.*, 2018). O início destes planos pode ser realizado com medidas vantajosas para os produtores que voluntariamente as aplicarem, como por exemplo, ajuda económica caso a prevalência da doença na exploração diminua numa determinada percentagem e a eliminação de barreiras à exportação de animais para países considerados livres de IBR (Ackermann & Engels, 2006; Maresca *et al.*, 2018). Isto permite uma grande redução de custos, no entanto, é apenas o primeiro passo. À medida que a prevalência da doença for diminuindo, o abate dos animais portadores pode ser considerada uma opção financeiramente mais viável, e o método de abate selectivo deve ser aplicado (Raaperi *et al.*, 2014; Sibhat *et al.*, 2018).

De acordo com um estudo realizado na Bélgica, onde se classificaram 77 doenças infecciosas presentes na Europa, seis delas foram consideradas importantes pelos três meios utilizados para obtenção de informação (questionário aos médicos veterinários, dados laboratoriais e metodologia de categorização de prioridade). Nestas seis doenças encontrava-se a rinotraqueíte infecciosa bovina, para a qual foram revistos 13 dos 76 artigos utilizados neste estudo. Como conclusão, foram definidas várias medidas de biossegurança que englobavam seis categorias (movimentação de animais, transmissão vertical e venérea, contacto direto com portadores, contaminação de água e alimentação e contaminação indireta através de fómites, assim como contaminação ambiental e humana) e cinco práticas (gestão geral do efetivo, como a densidade animal, ventilação e camas, medidas de higiene, tratamento dos animais doentes e maneio dos partos e bezerros). Estas medidas devem ser adaptadas consoante as prioridades e necessidades de cada exploração, sendo por isso necessário identificar quais as doenças que afetam o efetivo (Ribbens *et al.*, 2018).

Existe uma diversidade de medidas que podem ser aplicadas nas explorações para a diminuição da prevalência de IBR e sua posterior erradicação. A prioridade dos produtores deverá ser a implementação de boas práticas de maneio e medidas de higiene, assim como, a vacinação de todos os animais e controlo da entrada de novos animais na exploração. Se possível, animais identificados como positivos deveriam ser eliminados e fêmeas positivas não deveriam ser utilizadas para reprodução. O papel do

Médico Veterinário torna-se extremamente importante, pois este tem o conhecimento necessário para identificar possíveis fatores de risco e implementar medidas de controlo adequadas à exploração (Ribeiro, 2010; Ribbens *et al.*, 2018).

A movimentação de animais entre explorações é considerada um dos maiores riscos (Ackermann & Engels, 2006), sendo necessário a realização de testes serológicos antes da entrada dos animais noutra exploração, ou a sua permanência numa zona de quarentena durante 3 semanas, com separação física dos outros animais (Nardelli *et al.*, 2008; Newcomer, 2016). Visto que a densidade de animais na exploração é um dos fatores a ter em conta na disseminação do vírus, explorações com elevado número de animais são aconselhadas a dividir os animais por lotes, com uma separação física que impeça a transmissão do vírus entre eles (Ackermann & Engels, 2006; Nardelli *et al.*, 2008).

De acordo com a legislação da União Europeia (2004/558 CE), para se obter aprovação para a implementação de um programa de erradicação de IBR, é necessário implementar três proibições: a compra de animais positivos, o uso de vacinas não marcadas e a utilização de sémen de touros positivos ao BoHV-1 (Nardelli *et al.*, 2008). Para uma exploração obter o Estado de "IBR free" é necessário primeiro a recolha de 3 amostras do leite do tanque, com intervalos entre si de 3 meses, mas com a condição de que o tanque não possua leite de mais de 50 animais. Para além disso deve ser feito a testagem serológica a todas as fêmeas não lactantes e a todos os machos da exploração com mais de 9 meses (Raaperi *et al.*, 2014). Duas amostras de leite do tanque (com menos de 50 animais) com intervalos de 3 a 12 meses, juntamente com testes serológicos individuais (com intervalo inferior a 12 meses) de todos as fêmeas não lactantes com mais de 24 meses são necessários para que o titulo de "IBR free" seja mantido pela exploração (Raaperi *et al.*, 2014).

Apesar de todos os motivos a favor da erradicação da IBR, entre os quais, um melhor estado sanitário dos animais e melhoria da saúde em geral, não nos podemos esquecer que a conquista da erradicação acarreta consigo um custo muito elevado. Os benefícios e custos destes programas devem ser tidos em conta na hora de tomar uma decisão. Uma das preocupações constantes que envolve este tema refere-se à possibilidade de recombinação dos vírus usados em vacinas e dos vírus de campo, algo que já foi possível em ambiente experimental (Ackermann & Engels, 2006; Jones, 2010; Raaperi *et al.*, 2014).

8.1 Vacinação

Segundo Ames *et al.* (1985), a imunidade materna tem interferência na eficácia da vacinação. No estudo realizado utilizaram vacinas vivas modificadas e verificaram que os animais ainda possuíam anticorpos maternos aos 3 meses de idade, e que não seroconverteram quando lhes foi administrada a vacina. No entanto, aos seis meses de idade, em que a imunidade materna já se encontrava ausente, pois não se detetou anticorpos contra BoHV-1, a vacina foi capaz de gerar uma resposta serológica com aumento significativo de anticorpos.

Atualmente, existem vários tipos de vacinas de 1º geração no mercado com o vírus atenuado ou inativado. A duração da imunidade destas vacinas varia entre os 6 e 9 meses, não sendo possível diferenciar entre animais vacinados e os infectados pelo vírus de campo (Ribeiro, 2010). Nas vacinas com o vírus atenuado este mantem a sua capacidade de replicação, podendo estabelecer latência e, hipoteticamente, tornar-se virulento, pois tem capacidade imunodepressora, especialmente em animais jovens, sendo possível ser excretado pelos animais vacinados. A sua administração a animais gestantes pode originar abortos. No entanto, estas vacinas proporcionam uma rápida resposta imunitária, celular e humoral, e de longa duração, diminuindo a excreção em animais infectados (Jones, 2010; Raaperi *et al.*, 2014). Em comparação, as vacinas inativadas não causam abortos ou imunodepressão, nem o agente vacinal consegue permanecer latente, não havendo excreção do vírus vacinal. São bastante eficazes em animais com infeções latentes (Ackermann & Engels, 2006). No entanto, a resposta imunitária é de menor duração em comparação com as vacinas anteriores, e são necessários adjuvantes potentes para estimular uma resposta imunitária, levando a reações no local de injeção e consequentemente possíveis repercussões futuras a nível da carcaça (Jones, 2010). As vacinas convencionais são habitualmente associadas, úteis para a prevenção do complexo respiratório bovino, como por exemplo a Rispoval 4®, que contém os vírus BoHV-1, BVD, BRSV e Pi3. Em vários estudos realizados ao longo do tempo, verificou-se que animais vacinados com este tipo de vacinas possuíam títulos de anticorpos mais elevados e desenvolviam uma resposta imunitária mais rápida quando comparados com animais não vacinados (Peters *et al.*, 2004; Salt *et al.*, 2007). Para além disso, a duração e expressão de sinais clínicos era menor em animais vacinados, possivelmente devido à proteção fornecida pelas vacinas (Peters *et al.*, 2004). Em estudos mais recentes, foi possível demonstrar a diminuição da excreção de

partículas virais em animais vacinados (Salt *et al.*, 2007). Este tipo de vacinas também pode ser aplicado por via intranasal, o que permite, para além de uma diminuição da expressão e duração dos sinais clínicos, uma diminuição da excreção viral e proteção imunitária de animais bastante jovens, pois ultrapassam melhor a imunidade materna (Xue *et al.*, 2010; Mahan *et al.*, 2016). Uma única dose permite proteger animais seronegativos durante um mínimo de 196 dias, enquanto em animais seropositivos a proteção alcança os 105 dias (Mahan *et al.*, 2016). Uma das vantagens destas vacinas é que permitem ultrapassar a imunidade materna em animais muito jovens, permitindo a sua proteção quando esta diminui, encurtando assim a janela de sensibilidade que ocorre quando usamos vacinas administradas por via parenteral. Uma segunda vantagem é uma resposta imunitária no local de entrada do vírus, ou seja, na mucosa nasal, prevenindo mais eficazmente a infeção em vez de diminuir a ocorrência da doença (Xue *et al.*, 2010; Mahan *et al.*, 2016).

Devido ao facto de que a utilização destas vacinas não permitirem a distinção entre animais vacinados e infectados, não sendo por isso possível a sua utilização em programas de abate seletivo ou controlo e erradicação de IBR, houve a necessidade de desenvolver novas vacinas. Assim foram criadas as vacinas vivas "deletadas", as vacinas de subunidades e as vacinas de DNA (Babiuk *et al.*, 1996). Além de serem vacinas mais seguras permitem a diferenciação entre animais vacinados e infectados pelo vírus de campo, sendo de grande utilidade nos programas de erradicação e já utilizadas largamente pela Europa (Babiuk *et al.*, 1996; Jones, 2010; Raaperi *et al.*, 2014, 2015).

As vacinas "deletadas" podem ser vivas ou inativadas (Raaperi *et al.*, 2014) e consistem na utilização de uma estirpe vacinal onde pelo menos o gene de uma proteína viral foi alvo de deleção no genoma viral. Uma das mais utilizadas é a vacina com estirpe "deletada" no gene da glicoproteína E, em que os animais vacinados não produzem anticorpos anti-gE, ao contrário dos animais infectados. O diagnóstico pode assim ser feito através de testes ELISA específicos que detectam estes anticorpos (Raaperi *et al.*, 2014, 2015). Estes testes têm uma especificidade que vai de 72% a 92,7% e uma sensibilidade que varia entre 92% e 100% (Raaperi *et al.*, 2014). Para além de desencadearem uma resposta imunitária mais rápida (7ºdia após vacinação) (Jones, 2010), conferem um maior grau de proteção, levando à diminuição ou ausência de sinais clínicos, não ocorrendo viremia nem excreção do vírus vacinal. Por outro lado, diminuem a excreção do vírus de campo em animais infectados (Raaperi *et al.*, 2014).

A utilização destas vacinas por via intranasal pode levar a uma pequena excreção de partículas virais, no entanto originam uma rápida resposta imunitária, útil em animais em risco (Raaperi *et al.*, 2014)

Raaperi *et al.* (2015) realizaram um estudo comparativo de seis anos entre explorações que vacinavam com vacinas inativadas "marcadas" e explorações que não o faziam e verificaram que a vacinação tinha um impacto significativo na saúde e produtividade dos efetivos. Para além da diminuição do intervalo entre partos e do período seco, verificou-se ainda que efetivos vacinados obtiam uma maior produção de leite por vaca no fim do ano. Em efetivos não vacinados detectou-se um maior número de inseminações e menor taxa de conceção na primeira inseminação. Animais vacinados apresentavam também menos sinais clínicos de doença, como por exemplo, pneumonia e conjuntivite. É importante referir que todas as explorações estavam infetadas (Raaperi *et al.*, 2015).

As vacinas de subunidades consistem na utilização de glicoproteínas virais purificadas, particularmente das que estão envolvidas nos processos de entrada do vírus nas células e que são essenciais à indução de resposta imunitária (Babiuk *et al.*, 1996; Ribeiro, 2010).

As vacinas de DNA consistem na utilização do gene que codifica a glicoproteína D, integrado num plasmídeo vacinal. Pensa-se que proporcionará imunidade mais prolongada, mas ainda serão necessários mais estudos para se obter uma conclusão fiável (Babiuk *et al.*, 1996; Ribeiro, 2010).

Os protocolos vacinais aplicados numa exploração devem ser adequados às necessidades do efetivo, ao tipo de vacina utilizada e deve ser feita uma análise custo benefício de forma a serem apontadas as vantagens e desvantagens da sua implementação (Ribeiro, 2010).

Capítulo 2

1. Objectivos

Este estudo pretendeu determinar a ocorrência de rinotraqueite infecciosa bovina nas explorações visitadas no âmbito do estágio curricular. Foram analisados os factores de risco associados à ocorrência desta infecção em explorações de bovinos de leite, nas regiões de Vila do Conde, Estarreja e Ilha Terceira.

Para isto, foram estudadas variáveis obtidas a partir de um questionário epidemiológico, observação das condições das explorações e animais, análise do histórico das explorações e rastreios previamente realizados.

2. Material e Métodos

Este estudo foi realizado nas explorações visitadas no âmbito do estágio curricular do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, tendo abrangido explorações de bovinos leiteiros do concelho de Vila do Conde, Estarreja e da Ilha Terceira, Açores. As explorações de Vila do Conde e Estarreja foram visitadas aquando do estágio na empresa MPL Vet®, nos meses de Agosto e Setembro de 2018, enquanto que as explorações da Ilha Terceira foram visitadas durante o estágio na União das Cooperativas de Lacticínios Terceirense Ucrl (UNICOL®), nos meses de Novembro e Dezembro de 2018. Ao todo foram estudadas 45 explorações, nas quais se efetuou um questionário epidemiológico. As explorações do continente eram exclusivamente de estabulação, enquanto que nos Açores, Ilha Terceira, as explorações eram na sua maioria de pastoreio, com um sistema de rotação de pastagens em zonas diferentes da ilha.

2.1 População

Nos meses de Agosto e Setembro de 2018, foram estudadas 15 explorações, dentro das quais 4 pertenciam ao concelho de Estarreja e 11 ao concelho de Vila do Conde. Todas as explorações eram de aptidão leiteira e estabuladas, e foram visitadas no âmbito do estágio na empresa MPL Vet®. Para além da aplicação de um questionário epidemiológico, foi possível ter acesso ao histórico das explorações, em especial ao estado sanitário das mesmas ao longo dos anos. Este controlo foi realizado, no mínimo, anualmente, pela empresa em questão.

Nos meses de Novembro e Dezembro de 2018, foram estudadas 30 explorações na ilha Terceira, Açores. Todas as explorações, tais como as anteriores, eram de aptidão leiteira. Na sua maioria, estas explorações eram de pastoreio (n=26), e foram visitadas no âmbito de estagio na UNICOL®, União das cooperativas de Lacticínios Terceirense. Foi aplicado um questionário epidemiológico e foi possível ter acesso a análises serológicas realizadas nesse ano, no âmbito do programa de erradicação de BVD implementado na ilha, nas quais se fizeram análises para diagnóstico de BVD, IBR e Neospora.

2.2 Questionário epidemiológico

Foi elaborado um questionário epidemiológico para preenchimento do proprietário ou responsável pela exploração de bovinos visitada. Neste questionário caracterizou-se a exploração e avaliaram-se factores que incluíram as condições de biossegurança, as instalações, o maneio e saúde dos animais. Ao todo foram feitas 33 questões, entre as quais 6 avaliavam a exploração e as suas condições. A biossegurança foi avaliada através de 11 questões e o maneio por 7 questões. Por fim, a saúde dos animais foi avaliada através de 9 questões, de entre as quais 3 eram questões abertas, onde o proprietário identificava quer os problemas respiratórios quer reprodutivos presentes na exploração, assim como, a descrição do plano vacinal aplicado no efectivo.
O modelo do questionário efectuado segue em anexo.

2.3 Testes serológicos

No concelho de Vila do Conde e Estarreja a análise do estado sanitário dos efectivos visitados era realizado pela empresa MPL Vet®, através de análises ao leite do tanque e soro de vacas repetidoras, ou seja, vacas que repetiam os cios mesmo após inseminação, ou suspeitas de doença. As análises eram feitas através de um kit comercial SEROMILK®, que se baseia na técnica ELISA, fornecido pela empresa HIPRA® como parte do seu acompanhamento técnico às explorações.
Na ilha Terceira, o controlo do efectivo era realizado pelos serviços de sanidade locais, através do kit comercial IDEXX IBR gE®, e as amostras seguiam para o Laboratório Regional de Veterinária. Eram analisadas amostras do leite do tanque, assim como, o soro dos animais do efectivo. Os dados mais recentes foram obtidos durante a implementação de um programa de erradicação de BVD aplicado na ilha, que decorreu ao longo do ano de 2018.

2.4 Análise de dados

A análise foi efetuada com recurso ao programa SPSS 22® para Windows XP. Foi realizada análise estatística descritiva com recurso à frequência e estatística descritiva.

Estudou-se a associação entre variáveis pelo teste exato de Fisher. Um nível de significância de $p<0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

3. Resultados

Das 45 explorações de bovinos estudadas, 53,3% (n=24) tinham pelo menos um animal positivo.

Quanto à localização das explorações positivas, 16,7% (n=4) pertenciam ao Concelho de Estarreja, 45,8% (n=11) pertenciam ao Concelho de Vila do Conde e 37,5% (n=9) pertenciam à Ilha Terceira nos Açores.

A ocorrência de explorações positivas foi superior em explorações com mais de 100 animais (59,1%) mas as diferenças não foram estatisticamente significativas (p=0,448).

3.1 Ocorrência da infeção por IBR em relação às medidas de biossegurança nas explorações

O resumo da ocorrência da infeção por IBR em relação às medidas de biossegurança nas explorações encontra-se na Tabela 1. Quanto à origem dos animais de reposição, observou-se uma ocorrência mais elevada em explorações em que a reposição de animais era interna (63,0%) em relação às explorações que tinham práticas de reposição do tipo misto (38,9%). As diferenças não foram estatisticamente significativas (p=0,112).

As duas explorações cuja origem dos vitelos era fora das explorações foram positivas a IBR. Quando a origem da reposição dos vitelos era interna, 51,2% das explorações foram positivas. As diferenças não foram estatisticamente significativas (p=0,107).

Nenhuma exploração do estudo tinha área de quarentena nem efetuava limpeza e desinfecção da área do local de parto. Em explorações situadas em zonas que não apresentaram uma elevada densidade de explorações, a ocorrência foi significativamente mais elevada (85,7%) comparativamente a explorações que se situavam em zonas de densidade elevada (47,4%) (p=0,049).

A ocorrência foi significativamente menor em explorações com outras contíguas (41,4%) do que em explorações que não tinham explorações contiguas (75,0%) (p=0,028).

A ocorrência de IBR foi superior em explorações que efetuavam controlo microbiológico da água e do alimento (61,3%) em relação às explorações que não efetuavam este tipo de controlo (35,7%). As diferenças não foram estatisticamente significativas (p=0,110).

As explorações cujos animais frequentavam feiras ou concursos de animais apresentaram valores de ocorrência mais elevados (66,7%) em comparação com os animais que não o faziam (51,3%). As diferenças não foram estatisticamente significativas (p=0,477).

Tabela 1 - Ocorrência da infeção por IBR em relação às medidas de biossegurança nas explorações.

Variáveis	**Explorações positivas (n; %) (n=24)**	**Ocorrência (%)**	**p**
Origem dos animais de reposição			0,112
Interna	17 (70,8%)	63,0%	
Mista	7 (29,2%)	38,9%	
Vitelos comprados de várias origens			0,107
Interna	22 (91,7%)	51,2%	
Mista	2 (8,3%)	100%	
Elevada densidade de explorações na área			0,049*
Sim	18 (75,0%)	47,4%	
Não	6 (25,0%)	85,7%	
Explorações contíguas em pastoreio			0,028*
Sim	12 (50,0%)	41,4%	
Não	12 (50,0%)	75,0%	
Controlo microbiológico da água e do alimento			0,110
Sim	19 (79,2%)	61,3%	
Não	5 (20,8%)	35,7%	
Participação em feiras de gado			0,477
Sim	4 (16,7%)	66,7%	
Não	20 (83,3%)	51,3%	

*p<0,05 – estatisticamente significativo

3.2 Ocorrência da infeção por IBR em relação ao maneio reprodutivo

Quanto ao maneio reprodutivo, a ocorrência foi superior em explorações que utilizavam práticas de inseminação artificial (55,8%). A ocorrência foi superior em explorações que não utilizavam o touro para inseminação (66,7%) relativamente às explorações em que recorriam ao touro para inseminação (41,7%). As diferenças não foram estatisticamente significativas (p=0,091). A ocorrência de IBR foi superior quando as explorações utilizavam sémen submetido a um controlo de doenças, ou seja, sémen obtido através dos centros de inseminação (66,7%). Nas explorações que utilizavam touro não era realizado qualquer controlo do sémen.

3.3 Ocorrência da infeção por IBR em relação às características das instalações

O resumo da ocorrência da infeção por IBR em relação às instalações das explorações encontra-se na Tabela 2.

Nas explorações em que os animais estavam estabulados, a ocorrência de IBR foi superior e a diferença foi estatisticamente significativa (78,9%) (p=0,007).

Nestas explorações, a ocorrência de IBR foi superior em explorações que tinham equipamento para ventilação artificial (88,9%) em relação àquelas que não apresentavam este equipamento (44,4%). Estas diferenças foram estatisticamente significativas (p=0,012). Relativamente às explorações fechadas intensivas, a ocorrência de IBR foi superior em explorações em que a ventilação foi considerada boa. Estas diferenças foram estatisticamente significativas (p=0,007). Relativamente à ventilação dos vitelos, a exploração em que a ventilação foi considerada boa foi positiva. A ocorrência foi semelhante em explorações em que a ventilação foi considerada má (60,0%) ou média (60,9%). Todas as explorações deste estudo tinham separação física do meio exterior.

Tabela 2 - Ocorrência da infeção por IBR em relação às instalações das explorações.

Variáveis	**Explorações positivas (n; %) (n=24)**	**Ocorrência (%)**	**p**
Estabulação			0,007*
Sim	15 (62,5%)	78,9%	
Não	9 (37,5%)	52,9%	

Equipamento de ventilação artificial			0,012*
Sim	8 (33,3%)	88,9%	
Não	16 (66,7%)	44,4%	
Qualidade da ventilação artificial			0,007
Boa	7 (29,2%)	100%	
Média	6 (25,0%)	60,0%	
Má	2 (8,3%)	66,7%	
Não tem equipamento	9 (37,5%)	36,0%	

*p<0,05 – estatisticamente significativo

3.4 Ocorrência da infeção por IBR em relação às práticas de maneio

O resumo da ocorrência da infeção por IBR em relação às práticas de maneio encontra-se na Tabela 3.

Relativamente às práticas de administração de colostro, a ocorrência foi superior em explorações que tinham esta prática por rotina (55,8%) mas as diferenças não foram estatisticamente significativas (p=0,076).

A ocorrência foi ligeiramente superior em explorações que não tinham como prática administração de leite mamítico (57,1%) e, foi também superior em explorações que administravam leite de substituição (73,3%). As diferenças encontradas não foram estatisticamente significativas.

Quanto ao alojamento de vitelos até ao desmame, a ocorrência foi superior em explorações com alojamento individual (64,3%) quando comparado com o alojamento em grupo (62,5%) ou alojamento em pastagem (33,3%). As diferenças encontradas não foram estatisticamente significativas (p=0,160).

Quanto ao material da cama para as vacas, as únicas duas explorações que usavam camas de serrim foram ambas positivas. A ocorrência foi muito elevada em explorações que usavam como material os colchões (81,8%). As diferenças encontradas foram estatisticamente significativas (p=0,036). A ocorrência em explorações que usavam como material a palha (42,9%) ou os animais estavam no pasto (40,0%) foi semelhante.

Relativamente ao material da cama para vitelos observou-se muita variabilidade no mesmo. Quatro explorações que usavam camas de serrim foram todas positivas. A ocorrência foi muito elevada em explorações que usavam como material a palha

(73,3%). A ocorrência de explorações com chão de ripado foi de 42,9%, de cimento 25,0% e as explorações em que a cama era o pasto foi de 33,3%. As diferenças encontradas foram estatisticamente significativas (p=0,020).

Tabela 3 - Ocorrência da infeção por IBR em relação às práticas de maneio das explorações.

Variáveis	**Explorações positivas (n; %) (n=24)**	**Ocorrência (%)**	**p**
Administração de colostro			0,076
Sim	24 (100%)	55,8%	
Não	0 (0,0%)	0,0%	
Administração de leite mamítico			0,632
Sim	12 (50,0%)	50,0	
Não	12 (50,0%)	57,1%	
Administração de leite de substituição			0,053
Sim	11 (45,8%)	73,3%	
Não	13 (54,2%)	43,3%	
Alojamento dos vitelos até ao desmame			0,160
Pastagem	5 (20,8%)	33,3%	
Grupo	10 (41,7%)	62,5%	
Individual	9 (37,5%)	64,3%	
Material das camas			0,036*
Colchões	9 (37,5%)	81,8%	
Palha	3 (12,5%)	42,9%	
Pasto	10 (41,7%)	40,0%	
Serrim	2 (8,3%)	100%	
Material das camas dos vitelos			0,020*
Cimento	1 (4,2%)	25,0%	
Palha	11 (45,8%)	73,3%	
Pasto	5 (20,8%)	33,3%	
Ripado	3 (12,5%)	42,9%	
Serrim	4 (16,7%)	100%	

*p<0,05 – estatisticamente significativo

3.5 Ocorrência da infeção por IBR em relação à sanidade

Relativamente à limpeza das instalações dos vitelos a ocorrência foi mais elevada em explorações que faziam a limpeza semanal (83,3%). A ocorrência de IBR em explorações que faziam a limpeza diária foi de 60,0% e, 57,9% quando a limpeza era efetuada sempre que necessário. As diferenças não foram estatisticamente significativas (p=0,166).

A ocorrência foi superior em explorações que desparasitavam os animais (54,5%). As diferenças não foram estatisticamente significativas (p=0,213).

A ocorrência foi igual em explorações que apresentavam problemas respiratórios relativamente às explorações que não apresentavam este problema (50,0% respetivamente). A ocorrência foi ligeiramente superior em explorações que apresentavam problemas reprodutivos (56,5%). As diferenças não foram estatisticamente significativas (p=0,661).

Quanto à ocorrência da infeção relativamente a outras infeções ou patologias a ocorrência foi mais elevada em explorações que não estavam infetadas por BVD (60,0%), em explorações que apresentavam BRSV (80,0), em explorações com parainfluenza tipo 3 (80,0%), em explorações com infeção por *Staphylococcus aureus* (87,5%), em explorações sem infeção por *Escherichia coli* (53,5%), em explorações sem infeção por *Cryptosporidium* (53,5%), em explorações sem infeção por Rotavirus, em explorações com infeção por *Neospora caninum*, em explorações com infeção por *Clostridium* spp. e em explorações com mamites (75,0%).

4. Discussão

A ocorrência de explorações positivas foi superior nas explorações localizadas no concelho de Vila do Conde e em explorações com mais de 100 animais. Isto vai de encontro ao que se referiu na revisão bibliográfica, pois nas explorações "mais intensivas" e estabuladas há um maior contacto entre animais e, por isso, uma maior facilidade na dispersão do vírus pelo ar ou por contacto directo e transmissão aos restantes animais do efectivo (Wentink *et al.*, 1993; Mars *et al.*, 1999; Solis-Calderon & Segura-Correa, 2003; Benoît *et al.*, 2007; Nandi *et al.*, 2009; Woodbine *et al.*, 2009; Cowley *et al.*, 2011; Mahajan *et al.*, 2013; Raaperi *et al.*, 2014; Sibhat *et al.*, 2018).

Neste trabalho, observou-se uma maior ocorrência de IBR em explorações cuja reposição era feita com animais de origem interna, ou seja, com animais nascidos e criados na exploração. Este resultado sugere a circulação do vírus e infeção de animais aparentemente sãos. Os herpesvírus permanecem nas explorações através da sua capacidade de permanecer em latência no organismo dos animais, tornando possível a disseminação e transmissão do vírus após reactivação. A permanência de animais com infecção latente e o seu uso reprodutivo favorece essa situação, daí a importância da erradicação da doença se iniciar dentro da exploração, com medidas de profilaxia, vacinação e eliminação de animais portadores (Benoît *et al.*, 2007). Por outro lado, o facto de não haver uma associação significativa entre as explorações que utilizavam animais de reposição, externos a esta, e a ocorrência de IBR pode sugerir um maior cuidado no controlo de animais importados (Solis-Calderon & Segura-Correa, 2003).

No presente estudo verificou-se que efectivos que não possuíam uma elevada densidade de explorações na sua área, ou que tinham explorações contiguas, apresentaram uma menor percentagem de ocorrência de IBR. Estes resultados são interessantes e sugerem que factores externos à exploração não possuem uma importância tão grande na infecção e disseminação do vírus como foi colocado em hipótese no início deste estudo durante a formulação do questionário. Isto porque, explorações contíguas ou a elevada densidade de explorações numa determinada área são um risco a ter em consideração caso estas sejam positivas (daí a importância de analisar os dados numa perspectiva de positividade), pois a disseminação pode ocorrer por contacto directo dos animais, no pasto ou através das vedações, por via de aerossóis, fómites ou pessoas que circulem entre efectivos (Woodbine *et al.*, 2009; Raaperi *et al.*, 2014; Veldhuis *et al.*, 2017).

No presente estudo não se analisaram se as explorações da mesma área ou contíguas eram positivas, algo que poderá ser tido em consideração em estudos futuros.

Mais uma vez, ao contrário do que seria de esperar, a infeção por IBR ocorreu de forma mais elevada em explorações que afirmavam efetuar um controlo microbiológico da água e dos alimentos. Apesar disso, durante a visita às explorações, a maioria apresentava indícios de falta de higiene dos bebedouros e manjedoura. A falta de limpeza e desinfeção das superfícies usadas para fornecer água e alimento aos animais leva a que o vírus permaneça nestas durante mais tempo, contaminando assim os animais que as utilizarem (Wentink *et al.*, 1993; Takiuchi *et al.*, 2001; Ribeiro, 2010; Raaperi *et al.*, 2010; Carbonero *et al.*, 2011).

Neste estudo foi possível observar que explorações que tinham como rotina a utilização dos seus animais nas feiras e concursos de gado possuíam uma maior ocorrência da doença. Esta situação é facilmente explicada devido ao contacto que ocorre entre animais de origens diferentes e o difícil controlo e rastreio destes antes de entrarem nestes eventos, visto que um animal pode estar infectado e não ser detectado nos primeiros dias da infecção, levando à possível transmissão do agente (Benoît *et al.*, 2007; Woodbine *et al.*, 2009; Raaperi *et al.*, 2014).

Relativamente ao maneio reprodutivo, verificou-se uma maior ocorrência da doença (55,8%) em explorações que utilizavam a inseminação artificial, e em explorações que não possuíam o seu próprio touro para reprodução (66,7%). Apesar de vários artigos demonstrarem que a inseminação artificial é uma forma de diminuir a disseminação do vírus, caso o sémen seja testado e negativo, a verdade é que as práticas de inseminação também desempenham um papel importante na infeção, tal como acontece em outras doenças infeciosas. Em muitas das explorações visitadas o responsável pela inseminação das vacas era o proprietário do efectivo ou um dos seus trabalhadores. Este facto prende-se com a importância de uma correcta técnica de inseminação e higiene, pois como foi referido na revisão bibliográfica, as secreções vaginais são uma forma de transmissão do vírus, que pode facilmente ocorrer de vacas doentes para vacas sãs, caso o inseminador não tenha os cuidados devidos (Takiuchi *et al.*, 2001; Ribeiro, 2010; Taylor *et al.*, 2013). Num estudo realizado na Estónia, foi observada uma maior prevalência de IBR nas explorações que possuíam um inseminador particular comparativamente àquelas que utilizavam um inseminador que trabalhava em diversas explorações. Uma das razões utilizada para explicar esta situação foi o facto do um inseminador particular ter uma contacto mais frequente com os animais da exploração,

quer seja para diagnóstico de cios ou tratamento de problemas uterinos, o que aumenta o risco de transmissão por via iatrogénica (Raaperi *et al.*, 2010). Em estudos futuros seria interessante observar e classificar a técnica de inseminação realizada nas explorações estudadas, sobretudo em relação aos cuidados de higiene, por forma a obter dados mais pormenorizados sobre esta variável.

A transmissão do vírus de forma indirecta está associada a aerossóis, logo a qualidade do ar e a ventilação das explorações é de extrema importância. Como seria de esperar, explorações estabuladas apresentaram uma ocorrência de IBR superior e com uma diferença estatisticamente significativa, de 78,9%. Isto deve-se não só à maior concentração de animais numa determinada área mas também a um ar mais contaminado e de menor qualidade (Ribeiro, 2010; Mahajan *et al.*, 2013; Veldhuis *et al.*, 2017). Segundo um estudo realizado por Mars *et al.* (1999), a transmissão do BoHV-1 pelo ar, entre animais sãos e infectados em estábulos adjacentes cujo único contacto era uma conduta de ar, ocorreu num período de 3 dias, que originou a infecção de todos os animais sãos. Não só se demonstrou a capacidade infectante do vírus através do ar, como também a sua capacidade de se propagar até uma distância de aproximadamente 4 metros (Mars *et al.*, 1999). No entanto, constatou-se que explorações com equipamento de ventilação, como por exemplo, ventoinhas, possuíam uma maior ocorrência da doença (88,9%) em comparação a explorações que não possuíam equipamentos. Este resultado foi surpreendente, pois contradiz estudos realizados que realçam a importância da ventilação e qualidade do ar nas explorações. No entanto, se tivermos em atenção que a maioria destes equipamentos estavam em mau estado, não fazendo uma correcta ventilação das instalações, torna-se mais evidente a razão destes resultados. Existe ainda a possibilidade dos equipamentos de ventilação serem uma forma de dispersar os viriões a longa distância. Para além disso, muitas vezes as ventoinhas, que constituíam o principal equipamento de ventilação, não se encontravam colocadas corretamente, o que levava à formação de túneis de ar e à não ventilação de toda a área, especialmente, junto aos animais. Em explorações cuja ventilação foi considerada boa também apresentaram maior percentagem da doença. Ao interpretar estes dados não nos podemos esquecer de que este tipo de classificação é subjectivo e que uma aparente boa ventilação não corresponde a uma boa qualidade do ar, sendo necessário um controlo mais quantitativo e objectivo desta variável.

Um dos factores que poderia diminuir a ocorrência de IBR seria a administração de colostro ao vitelos, de forma a estes obterem proteção das mães imunizadas. No entanto,

e apesar das diferenças não serem estatisticamente significativas, observou-se que explorações que tinham esta prática implementada obtiveram uma maior ocorrência da doença. Durante a realização do questionário, foi questionado se a administração do colostro era feita correctamente, ou seja, pelo menos dois litros nas primeiras seis horas de vida. Só as explorações que efectuavam correctamente a administração foram consideradas nesta questão. Apesar disso, existem sempre falhas na administração, especialmente quando os partos ocorrem durante a noite, pois caso o vitelo não mame, estará sem colostro durante algumas horas, até que lhe seja fornecido pela pessoa responsável. Caso se deixe o vitelo com a mãe e este mame sozinho, torna-se ainda mais difícil saber se ingeriu a quantidade necessária para que tenha uma boa imunidade. São estas falhas de encolostramento que originam resultados como este, pois apesar de os vitelos mamarem o colostro, se este não for dado nas quantidades e horas certas, o resultado é nulo, realçando a importância de um correcto encolostramento e medidas bem definidas para as diferentes situações. Uma forma de o proprietário de uma exploração saber se esta prática está a ser bem realizada é através da análise serológica dos vitelos, de forma a determinar qual o nível de imunidade que estes obtiveram através do colostro. Por outro lado, não podemos esquecer que a qualidade do colostro é também importante na imunidade do vitelo, e deve ser avaliada antes da sua administração. Um banco de colostro é uma boa forma de armazenar colostros de boa qualidade, para utilizar em situações em que a vaca não produza em quantidade suficiente ou a sua qualidade seja muito baixa (Cota, 2018).

Outro ponto que foi questionado foi o fornecimento de leite mamítico (leite de vacas com mamite diagnosticada) aos vitelos. Das 45 explorações visitadas, 24 afirmaram dar aos vitelos este tipo de leite, o que não só é preocupante pelo facto de ser uma forma de transmissão de agentes patogénicos das mães para os vitelos, como também é um problema de saúde pública, visto que a maioria das vacas com mamite diagnosticada é submetida a um tratamento com antibióticos (Franco & Roehe, 2007). Assim, estas explorações estão a perpetuar a permanência destes agentes patogénicos na exploração, como também estão a favorecer o aparecimento de resistências a antibióticos, que tem sido um dos problemas mais discutidos na actualidade. O aumento dos genes ligado à resistência aos antibióticos tem vindo a ser uma preocupação crescente, especialmente em termos de saúde pública. De acordo com um estudo realizado na China, cerca de 75% dos antibióticos fabricados eram utilizados na agricultura e medicina, sendo da responsabilidade destas áreas a implementação de medidas que originem a restrição na

aplicação de antibióticos, assim como a sua dosagem correcta (Cheng *et al.*, 2013). A contínua exposição a subdoses de antibióticos que não matam as bactérias alvo, leva a uma resposta por parte destas ao stresse ambiental, o que promove a expressão de mecanismos que aumentam a sua probabilidade de sobrevivência, assim como, a sobrevivência de espécies mais resistentes (Maillard, 2018; Jeamsripong *et al.*, 2019; Paul *et al.*, 2019). Num estudo realizado em Portugal, cerca de 90% dos antibióticos ingeridos pelos animais de produção originavam resíduos na urina e fezes, que ao não serem tratados e utilizados como fertilizantes (estrume), ou ao contactarem com o solo através de águas residuais, levam à disseminação destas substâncias no ambiente. Para além disso, este estudo revelou um aumento das resistências à amoxicilina e ácido clavulânico, tetraciclinas, trimetropim-sulfamidas e cloranfenicol, que representam grande parte dos antibióticos utilizados na produção de bovinos. Esta realidade é preocupante, sendo cada vez mais importante o uso cuidado e restrito destas substâncias (Amados *et al*, 2019).

Numa das explorações visitadas, na qual havia um problema de mamites provocada por *Staphylococcus aureus*, havia um protocolo de erradicação deste agente que não estava a ter os resultados esperados, pois surgiam sempre animais positivos. Durante a realização deste questionário, verificou-se que o proprietário administrava o leite contaminado aos vitelos, incluindo as fêmeas, Ora, este agente é extremamente contagioso pelo leite, ficando acantonado na glândula mamária de fêmeas jovens após a ingestão, durante longos períodos, até estas começarem a produzir leite. Nesse momento, esta bactéria torna-se patogénica, causando mamite e contaminando o leite. Resumindo, sendo o leite uma forma de transmissão do agente aos animais mais jovens, esta prática deve ser interrompida para que haja uma maior probabilidade de eliminação deste agente desta exploração (Kadlec *et al.*, 2012; Schoenfelder *et al.*, 2017; Sieber *et al.*, 2018).

Relativamente ao leite de substituição, verificou-se que explorações que o utilizavam apresentavam uma maior ocorrência de IBR. Sendo este vírus facilmente transmitido através de secreções nasais e oculares, a utilização dos baldes com tetinas por animais doentes e a sua falta de higienização leva a que partículas virais permaneçam nas suas superfícies e infectem animais saudáveis que as utilizem posteriormente. Mais uma vez observa-se a importância de práticas de higiene nas explorações, pois são uma forma essencial para a controlo e erradicação de doenças infecto-contagiosas como o caso do IBR (Nandi *et al.*, 2009; Veldhuis *et al.*, 2017).

Uma das práticas que teoricamente levaria à diminuição da disseminação de doenças, incluindo a abordada nesta dissertação, seria a separação dos animais e alojamento individual ate ao desmame. No entanto, observou-se que explorações que utilizavam este tipo de alojamento possuíam uma maior ocorrência de IBR. Isto porque, apesar de haver uma separação física entre os animais, estes ainda eram capazes de contactar uns com os outros, especialmente através do contacto pelos focinhos, zona principal onde ocorre a entrada do vírus no organismo. Por outro lado, estes animais tinham movimentos mais limitados e permaneciam mais próximos uns dos outros, o que favorecia a disseminação do vírus pelo ar (Mars *et al.*, 1999; Solis-calderon & Segura-correa, 2003; Raaperi *et al.*, 2010; Carbonero *et al.*, 2011).

Quanto ao material das camas, a ocorrência foi muito elevada nos efetivos que usavam como material os colchões. Este tipo de material, apesar de ser bom para o conforto dos animais, permite que as secreções infectantes de animais doentes permaneçam mais tempo na superfície de contacto, pois não são absorvidas. Esta situação facilita a transmissão do vírus, pois as camas são utilizadas por todos os animais do efetivo, tornando-se um meio de transmissão indireta da doença (Wentink *et al.*, 1993). No caso dos vitelos, a palha revelou ser o material que causava uma maior ocorrência de IBR. Este poderia ser considerado um bom material, pela sua capacidade de absorção, no entanto, seria necessário a sua remoção, higienização do local e reposição frequente, o que muitas vezes não acontece nas explorações. O mesmo se aplica quando o material utilizado é serrim.

As explorações que efectuavam uma limpeza semanal apresentavam maior ocorrência de IBR quando comparadas às que efectuavam uma limpeza mais frequente. O ideal seria realizar uma limpeza diária ou, pelo menos, quando se verificasse a necessidade da sua realização, para que os animais passassem o menor tempo possível em contacto com fluidos, secreções e fezes. No entanto, mais importante que a frequência com que se realiza a limpeza e desinfeção é a forma como esta se realiza. Para a eliminação de agentes patogénicos, incluindo o herpesvirus bovino tipo 1, é necessário o uso de desinfetantes apropriados, visto que a simples remoção do material da cama ou uso de água é ineficiente (Wentink *et al.*, 1993; Raaperi *et al.*, 2010; Carbonero *et al.*, 2011) .

Outro ponto questionado foi a realização da desparasitação dos animais, que era feita na maioria das explorações. Apesar disso, verificou-se que a ocorrência de IBR era superior nas explorações que tinham esta prática por rotina. Apesar de não se ter questionado qual o desparasitante utilizado, verificou-se que algumas explorações

utilizavam a mesma dose para todos os animais, o que significa que alguns animais eram subdosados, ou seja, não eram desparasitados, e outros eram sobredosados. A acção dos parasitas promove uma depressão do sistema imunitário, o que favorece a infecção. É importante referir que há cada vez mais resistências aos desparasitantes, especialmente às avermectinas e benzimidazoles. As resistências dos parasitas têm vindo a aumentar, não só devido ao seu uso extensivo e regular, como também à dosagem errada e ineficiência da sua aplicação. Num estudo realizado na Suécia, verificou-se que quando era o produtor a estimar a dose para cada animal e a administrar, a eficácia da desparasitação era menor. Uma das razões desta situação é a estimativa do peso feita, que vai influenciar a dose administrada (Gasbarre *et al.*, 2009; Areskog *et al.*, 2013).

Neste trabalho observou-se uma maior ocorrência de IBR nas explorações que apresentavam problemas reprodutivos, como por exemplo, abortos, perdas embrionárias, metrites e retenções placentárias. Apesar de as diferenças não serem estatisticamente significativas, vários estudos comprovam a relação entre alterações reprodutivas no efetivo e a prevalência de IBR na exploração (Mahajan *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2018; Sibhat *et al.*, 2018).

Por fim, a ocorrência foi superior em explorações que apresentavam infecção por BRSV, Parainfluenza tipo 3 e *Mycoplasma* spp. Estes agentes patogénicos estão envolvidos no complexo respiratório bovino, infectando os animais devido à imunodepressão provocada pelo BoHV-1 (Grissett *et al.*, 2015). Por outro lado, a associação pode também ser devida a vias de transmissão e factores de risco semelhantes (Carbonero *et al.*, 2011). Outro agente que faz parte do complexo respiratório bovino, o BVD, não se encontrou associado a explorações com IBR. Isto pode ser explicado pela implementação de um programa de erradicação de BVD que se encontrava a decorrer no período do estágio nos Açores, em que vários animais infectados tinham vindo a ser abatidos ao longo do ano de 2018 e planos de vacinação tem sido implementados nas explorações. Em relação à infecção por *Neospora caninum*, a ocorrência maior em explorações com infecção por BoHV-1 tem vindo a ser associada à reactivação de infecções crónicas devido, mais uma vez, à imunodepressão provocada pelo IBR (Lassen *et al.*, 2012).

As explorações que possuíam infecções por *Staphylococcus aureus* e *Clostridium* spp., possuíam também maior ocorrência de IBR. *Staphylococcus aureus* é um agente altamente contagioso e com grande presença no meio ambiente, sendo difícil de

eliminar ou mesmo controlar devido à sua elevada resistência a antibióticos (Kadlec *et al.*, 2012; Schoenfelder *et al.*, 2017; Sieber *et al.*, 2018). Este é também um agente causador de mamites, o que pode explicar a associação entre as explorações com mamites e IBR. Por outro lado, ambas as bactérias referidas facilmente se aproveitam da imunodepressão causada pelo BoHV-1, infetando o organismo dos animais do efetivo (Jones, 2010).

5. Conclusão

Após o término deste trabalho foi possível concluir que as explorações com maior densidade animal tinham uma maior prevalência da infecção. Devido à sua dimensão, são explorações que usam um maior número de equipamentos que podem contribuir para a transmissão de BoHV-1 entre os animais. Para além disso, são também as mais visitadas pelos técnicos, que poderão contribuir para a transmissão do agente. Por outro lado, nas explorações estabuladas a ocorrência da infecção foi maior, e estas coincidem com as explorações de maior densidade.

Concluindo, visto que a ocorrência de IBR nas explorações visitadas foi de 53,3%, é necessário adotar mais e melhores medidas preventivas de forma a diminuir a ocorrência da doença, como por exemplo, o controlo da entrada de animais oriundos de outras explorações, através de medidas de quarentena, e implementar medidas mais rígidas de biossegurança capazes de controlar a entrada e disseminação do vírus. É necessário também sensibilizar os proprietários para a utilização de programas vacinais, para que a curto e longo prazo não se verifique uma queda nas performances produtivas dos animais, melhorando-se assim o estatuto sanitário e a economia das explorações.

Capítulo 3

Bibliografia

Ackermann M, Engels M (2006) Pro and contra IBR-eradication. Veterinary Microbiology 113, 293–302.

Amados, P; Fernandes, R; Prudêncio, C; Duarte I (2019) Prevalence of antibiotic resistance genes in portuguese livestock manure. Antibiotics 8, 1–18.

Areskog M, Ljungström B, Höglund J (2013) Limited efficacy of pour-on anthelmintic treatment of cattle under Swedish field conditions. International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance 3, 129–134.

Asmare K, Sibhat B, Ayelet G, Zewdu E, Aragaw K, Skjerve E (2018) Serological evidence of Bovine herpesvirus-1, Bovine Viral Diarrhea virus and Schmallenberg virus infections in relation to reproductive disorders in dairy cattle in Ethiopia. Acta Tropica 178, 236–241.

Babiuk LA, Hurk SVDL Den, Tikoo SK (1996) Immunology of bovine herpesvirus 1 infection. Veterinary Microbiology 53, 31–42.

Benoît M, Julien T, Philippe K (2007) Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. Veterinary Research 38, 181–209.

Bezerra D, Chaves N, Sousa VE, Santos H, Perreira HM (2012) Prevalência e fatores de risco associados à infecção pelo herpesvírus bovino tipo 1 em rebanhos bovinos leiteiros no estado do Maranhão. Revista Brasileira de Ciência Veterinária 19, 158–162.

Carbonero A, Saa LR, Jara D V, García-bocanegra I, Arenas A, Borge C, Perea A (2011) Seroprevalence and risk factors associated to Bovine Herpesvirus 1 (BHV-1) infection in non-vaccinated dairy and dual purpose cattle herds in Ecuador. Preventive Veterinary Medicine 100, 84–88.

Chen X, Wang X, Qi Y, Wen X, Li C, Liu X (2018) Meta-analysis of prevalence of bovine herpes virus 1 in cattle in Mainland China. Acta Tropica 187, 37–43.

Cheng W, Chen H, Su C, Yan S (2013) Abundance and persistence of antibiotic resistance genes in livestock farms : A comprehensive investigation in eastern China. Environment International 61, 1–7.

Cota LMF (2018) Avaliação da transferência de imunidade passiva em vitelos de explorações leiteiras. Dissertação de mestrado Integrado em Medicina Veterinária, 27-

43.
Cowley DJB, Clegg TA, Doherty ML, More SJ (2011) Aspects of bovine herpesvirus-1 infection in dairy and beef herds in the Republic of Ireland. Acta Veterinária 53, 1–9.
Earley B, Sporer KB, Gupta S (2017) Invited review : Relationship between cattle transport , immunity and respiratory disease. The Animal Consortium 11, 486–492.
Fava, C; Pituco, EM; Angelino, JL (2002) Herpesvírus Bovino tipo 1 (HVB-l): revisão e situação atual no Brasil. Continuous Education Journal 5, 300–312.
Franco AC, Roehe PM (2007) Virologia veterinária. Virologia Veterinária. Editora da Universidade Federal de Santa Maria.
Ferreira RN (2009) Prevalência da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR) em touros bubalinos em propriedades localizadas no Amapá e Ilha de Marajó (PA), Brasil - Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária.
Gasbarre LC, Smith LL, Lichtenfels JR, Pilitt PA (2009) The identification of cattle nematode parasites resistant to multiple classes of anthelmintics in a commercial cattle population in the US. Veterinary Parasitology 166, 281–285.
Goolaerts A, Houtain J, Cay AB (2017) Characterization of three commercial ELISA kits for detection of BOHV-1 gE specific antibobodies in serum and milk samples and applicability of bulk milk for determination of herd status. Journal of Virological Methods 245, 66–72.
Grissett GP, White BJ, Larson RL (2015) Structured literature review of responses of cattle to viral and bacterial pathogens causing bovine respiratory disease complex. Journal of Veterinary Internal Medicine 29, 770–780.
Hou P, Wang H, Zhao G, He C, He H (2017) Rapid detection of infectious bovine Rhinotracheitis virus using recombinase polymerase amplification assays. BMC Veterinary Research 13, 1–9.
Jeamsripong S, Kalpravidh W, Mcgrane J, Padungtod P (2019) Characterizing antimicrobial use in the livestock sector in three south east asian countries. Antibiotics 8, 1–25.
Jones C (2010) Bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) is an important cofactor in the Bovine Respiratory Disease Complex. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice 26, 303–321.
Kadlec K, Feßler AT, Hauschild T, Schwarz S (2012) Novel and uncommon antimicrobial resistance genes in livestock- associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Clinical Microbiology and Infection 18, 745–755.

Lassen B, Orro T, Aleksejev A, Raaperi K, Järvis T, Viltrop A (2012) Neospora caninum in Estonian dairy herds in relation to herd size, reproduction parameters, bovine virus diarrhoea virus, and bovine herpes virus 1. Veterinary Parasitology 190, 43–50.

Mahajan V, Banga HS, Deka D, Filia G, Gupta A (2013) Comparison of diagnostic tests for diagnosis of Infectious Bovine Rhinotracheitis in natural cases of bovine abortion. Journal of Comparative Pathology 149, 391–401.

Mahan SM, Sobecki B, Johnson J, Oien NL, Meinert TR, Verhelle S, Mattern SJ, Bowersock TL, Leyh RD (2016) Efficacy of intranasal vaccination with a multivalent vaccine containing temperature-sensitive modified-live bovine herpesvirus type 1 for protection of seronegative and seropositive calves against respiratory disease. Journal of American Veterinary Association 248, 1280-1286.

Maillard J (2018) Resistance of bacteria to biocides. Microbiology Spectrum 6, 1–17.

Maresca C, Scoccia E, Dettori A, Felici A, Guarcini R, Petrini S, Quaglia A, Filippini G (2018) National surveillance plan for Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR) in autochthonous Italian cattle breeds : Results of first year of activity. Veterinary Microbiology 219, 150–153.

Mars MH, Bruschke CJM, Oirschot JT Van (1999) Airborne transmission of BHV1, BRSV, and BVDV among cattle is possible under experimental conditions. Veterinary Microbiology 66, 197–207.

Médici KC, Alfieri AA, Alfieri AF (2000) Prevalência de anticorpos neutralizantes contra o herpesvirus bovino tipo 1, decorrente de infecção natural, em rebanhos com disrúrbios reprodutivos. Ciencia Rural 30, 347–350.

Meyer G, Georgin J, Baranowski E, Gabriel A, Ros C, Bela S, Thiry E (2001) Latency and reactivation of a glycoprotein E negative bovine herpesvirus type 1 vaccine: influence of virus load and effect of specific maternal antibodies. Vaccine 19, 4795–4804.

Muratore E, Bertolotti L, Nogarol C, Caruso C, Lucchese L, Iotti B, Ariello D, Moresco A, Masoero L, Nardelli S, Rosati S (2017) Veterinary immunology and immunopathology surveillance of Infectious Bovine Rhinotracheitis in markervaccinated dairy herds : Application of a recombinant gE ELISA on bulk milk samples. Veterinary Immunology and Immunopathology 185, 1–6.

Nandi S, Kumar M, Manohar M, Chauhan RS (2009) Bovine herpes virus infections in cattle. Animal Health Research Reviews 10, 85–98.

Nardelli S, Farina G, Lucchini R, Valorz C, Moresco A, Dal R, Costanzi C (2008) Dynamics of infection and immunity in a dairy cattle population undergoing an eradication programme for Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR). Preventive Veterinary Medicine 85, 68–80.

Newcomer BW (2016) Diagnosis and control of viral diseases of reproductive importance: Infectious Bovine Rhinotracheitis and Bovine Viral Diarrhea. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice 32, 425–441.

OIE (1992) Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines. Capitulo 33, 322328.

OIE (2018) OIE Terrestrial Manual 2018. Capítulo 2.1.2, 114-152.

Oliveira R, Antonio R, Lemos A, Roehe PM (1998) Anticorpos monoclonais contra o Herpesvírus bovino tipo 5. Pesquisa Agropecuária de Gaúcha 4, 67–72.

Pasqualotto W, Sehnem S, Winck CA (2015) Incidência de Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR), Diarreia Viral Bovina (BVD) e Leptospirose em bovinos leiteiros da região oeste de Santa Catarina - Brasil. Revista em Agronegócio e Meio Ambiente 8, 249–270.

Paul D, Chakraborty R, Mandal SM (2019) Biocides and health-care agents are more than just antibiotics : Inducing cross to co-resistance in microbes. Ecotoxicology and Environmental Safety 174, 601–610.

Peters AR, Thevasagayam SJ, Wiseman A, Salt JS (2004) Duration of immunity of a quadrivalent vaccine against respiratory diseases caused by BHV-1, PI3V, BVDV, and BRSV in experimentally infected calves. Preventive Veterinary Medicine 66, 63–77.

Raaperi K, Nurmoja I, Orro T, Viltrop A (2010) Seroepidemiology of bovine herpesvirus 1 (BHV1) infection among Estonian dairy herds and risk factors for the spread within herds. Preventive Veterinary Medicine 96, 74–81.

Raaperi K, Orro T, Viltrop A (2014) Epidemiology and control of bovine herpesvirus 1 infection in Europe. The Veterinary Journal 201, 249–256.

Raaperi K, Orro T, Viltrop A (2015) Effect of vaccination against bovine herpesvirus 1 with inactivated gE-negative marker vaccines on the health of dairy cattle herds. Preventive Veterinary Medicine 118, 467–476.

Ribbens S, Riocreux F, Koenen F, Cassart D (2018) Classification of adult cattle infectious diseases: a first step towards prioritization of biosecurity measures. Transboundary and Emerging Diseases 65, 1991-2005.

Ribeiro HICL (2010) Rinotraqueite Infecciosa Bovina num efectivo de carne: Análise

multifactorial na perspectiva da medicina de grupo. Dissertação de mestrado Integrado em Medicina Veterinária, 32-42.

Ring SC, Graham DA, Sayers RG, Byrne N, Kelleher MM, Doherty ML, Berry DP (2018) Genetic variability in the humoral immune response to bovine herpesvirus-1 infection in dairy cattle and genetic correlations with performance traits. Journal of Dairy Science 101, 6190–6204.

Salt JS, Thevasagayam SJ, Wiseman A, Peters AR (2007) Efficacy of a quadrivalent vaccine against respiratory diseases caused by BHV-1, PI3V, BVDV and BRSV in experimentally infected calves. The Veterinary Journal 174, 616–626.

Sarangi LN, Thodangala N, Rana SK, Sri K, Leela N, Venkata R, Reddy C, Putla B, Muthappa PN, Sharma GK, Srinivasan V (2018) Evaluation of a specialized filter-paper matrix for transportation of extended bovine semen to screen for bovine herpesvirus-1 by real-time PCR. Journal of Virological Methods 257, 1–6.

Schoenfelder SMK, Dong Y, Feßler AT, Schwarz S, Schoen C, Köck R, Ziebuhr W (2017) Antibiotic resistance profiles of coagulase-negative staphylococci in livestock environments. Veterinary Microbiology 200, 79–87.

Sibhat B, Ayelet G, Skjerve E, Gebremedhin EZ (2018) Bovine herpesvirus-1 in three major milk sheds of Ethiopia : Serostatus and association with reproductive disorders in dairy cattle. Preventive Veterinary Medicine 150, 126–132.

Sieber RN, Skov RL, Nielsen J, Schulz J, Price LB, Larsen AR, Stegger M (2018) Drivers and dynamics of methicillin-resistant livestock- associated Staphylococcus aureus CC398 in pigs and humans in Denmark. Clinical Science and Epidemiology 9, 1–12.

Soares LBF (2017) Ocorrência da infecção pelo virus da diarreia viral bovina (BVDV) e rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) em búfalos no estado de Pernambuco. Pós-graduação em sanidade e reprodução de ruminantes, 21-23.

Solis-calderon JJ, Segura-correa VM (2003) Seroprevalence of and risk factors for Infectious Bovine Rhinotracheitis in beef cattle herds of Yucatan , Mexico. Preventive Veterinary Medicine 57, 199–208.

Pituco EM (2002) Caracterização de herpesvírus bovinos tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV -5) com anticorpos monoclonais. Pesquisa Veterinária do Brasil 22, 13–18.

Straub OC (1991) BHV-1 Infections Relevance and Spread in Europe. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 14, 175–186.

Takiuchi E, Alfieri AF, Alfieri AA (2001) Herpesvírus bovino tipo 1: Tópicos sobre a

infecção e métodos de diagnóstico. Ciências Agrárias 22, 203–209.

Taylor P, Biswas S, Bandyopadhyay S, Dimri U, Patra PH (2013) Bovine herpesvirus-1 (BHV-1)-a re-emerging concern in livestock: a revisit to its biology, epidemiology, diagnosis, and prophylaxis. Veterinary Quarterly 33, 37–41.

Tikoo SK, Campos M, Babiuk LA (1996) Bovine herpesvirus 1 (BVH-1): Biology, pathogenesis and control. Advances in Virus Research 45, 191–223.

Veldhuis A, Santman-berends I, Schauer B, Mars J, Waldeck F, Staubach C, Schaik G Van (2017) Epidemiological performance and subsequent costs of different surveillance strategies to control bovine herpesvirus type 1 in dairy farms. Preventive Veterinary Medicine 139, 105–114.

Viu MA, Dias LR, Lopes DT, Viu AF (2014) Rinotraqueíte infecciosa bovina: revisão. PUBVET, Publicações em Medicina Veterinária e zootecnia 8, 2-21.

Walz PH, Newcomer BW, Riddell KP, Scruggs DW, Cortese VS (2017) Virus detection by PCR following vaccination of naive calves with intranasal or injectable multivalent modified-live viral vaccines. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 29, 628–635.

Wentink GH, Oirschot JT van, Verhoeff J (1993) Risk of infection with bovine herpes virus 1 (BHV1): a review. The Veterinary Quarterly 15, 30–33.

Woodbine KA, Medley GF, Moore SJ, Ramirez- AM, Mason S, Green LE (2009) A four year longitudinal sero-epidemiological study of bovine herpesvirus type-1 (BHV-1) in adult cattle in 107 unvaccinated herds in south west England. Bio Med Central Veterinary Research 5, 1–12.

Workman A, Zhu L, Keel BN, Smith TPL, Jones C (2018) The Wnt signaling pathway is differentially expressed during the bovine herpesvirus 1 latency-reactivation cycle: evidence that two protein kinases associated with neuronal survival, akt3 and bmpr2, are expressed at higher levels during latency. Journal of Virology 92, 1–21.

Xue W, Ellis J, Mattick D, Smith L, Brady R, Trigo E (2010) Immunogenicity of a modified-live virus vaccine against Bovine Viral Diarrhea virus types 1 and 2, Infectious Bovine Rhinotracheitis virus, Bovine Parainfluenza-3 virus, and Bovine Respiratory Syncytial virus when administered intranasally in young calves. Vaccine 28, 3784–3792.

Anexos

Inquérito Epidemiológico

IBR- Factores de Risco

1. Dados da Exploração:

1.1.Tipo de exploração: Leite ☐ Mista ☐ Carne ☐

1.2. Dimensão do efectivo: _____

1.3.Local: _____

2. Biossegurança:

2.1. Partilha de espaço com bovinos de outras explorações:

Sim ☐ Não ☐

2.1.1 Participação em feiras de gado:

Sim ☐ Não ☐

2.2. Origem dos animais de reposição:

Interna ☐ Externa ☐ Mista ☐

2.3. Vitelos comprados de várias origens:

Sim ☐ Não ☐

2.4. Realização de quarentena antes da introdução dos animais na exploração:

Sim ☐ Não ☐

2.5. Elevada densidade de explorações na área:

Sim ☐ Não ☐

2.6. Explorações contiguas:

Sim ☐ Não ☐

2.7. Controlo da qualidade da água/alimento:

Sim ☐ Não ☐

2.8. Limpeza/ desinfeção do local de parto:

Sim ☐ Não ☐

(Desinfetante utilizado na limpeza: _____)

2.9. Reprodução: Touro ☐ Inseminação Artificial ☐

2.9.1. Controlo regular da qualidade do sémen:

Sim ☐ Não ☐

3. Instalações:

3.1 Estabulação:

Sim ☐ Não ☐

3.2 Ventilação: Com equipamento ☐ Sem equipamento ☐

Boa ☐ Média ☐ Má ☐

3.3 Separação física da exploração (ex. vedação):

Sim ☐ Não ☐

4. Maneio:

4.1. Administração de colostro:

Sim ☐ Não ☐

Em que condições? _____ (primeiras 6h e 4 litros)

4.2.Administração de leite mamítico:

Sim ☐ Não ☐

4.3. Administração de leite de substituição:

Sim ☐ Não ☐

4.4. Alojamento dos vitelos até ao desmame: Pastagem ☐ Individual ☐ Grupo ☐

4.5. Material das camas (vitelos/novilhas/vacas):_____

4.6. Higiene das camas: 3x/sem ☐ 2x/sem ☐ 1x/sem ☐Menos ☐

4.7.Ventilação no alojamento dos vitelos: Boa ☐ Média ☐ Má ☐

5. Saúde: (Abortos, infertilidade, pneumonias, rinites, diarreias,..)

5.1. Presença de problemas respiratórios:

Sim ☐ Não ☐

Se sim, quais?_____

5.2. Presença de problemas reprodutivos:

Sim ☐ Não ☐

Se sim, quais?_____

5.3. Desparasitação dos adultos:

Sim ☐ Não ☐

5.4. Desparasitação dos jovens:

Sim ☐ Não ☐

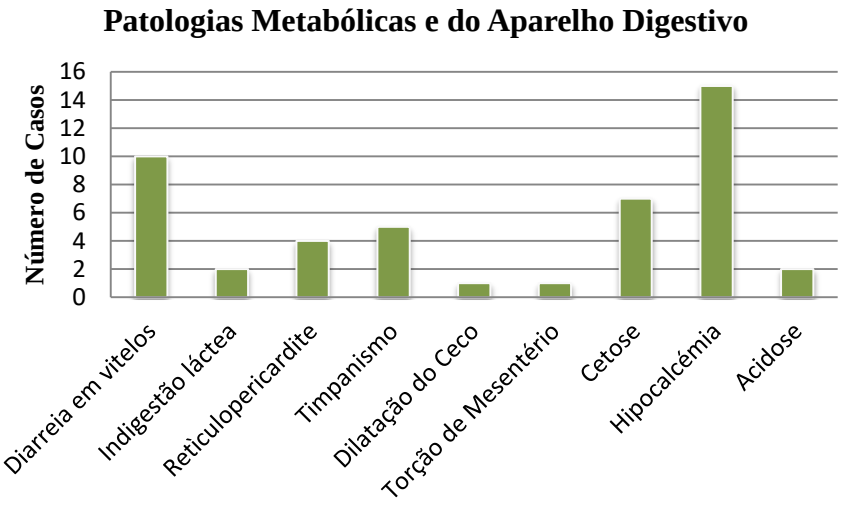
5.5. Infecção por IBR: Nunca ☐ Passado ☐ Presente ☐

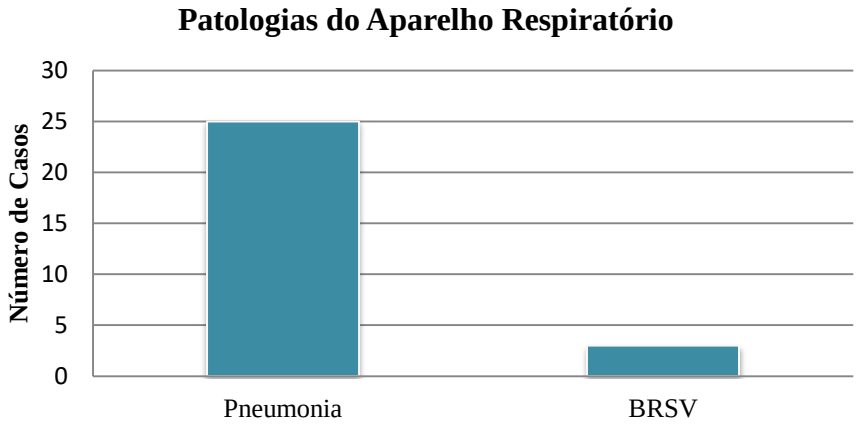
5.6. Doenças recorrentes na exploração:

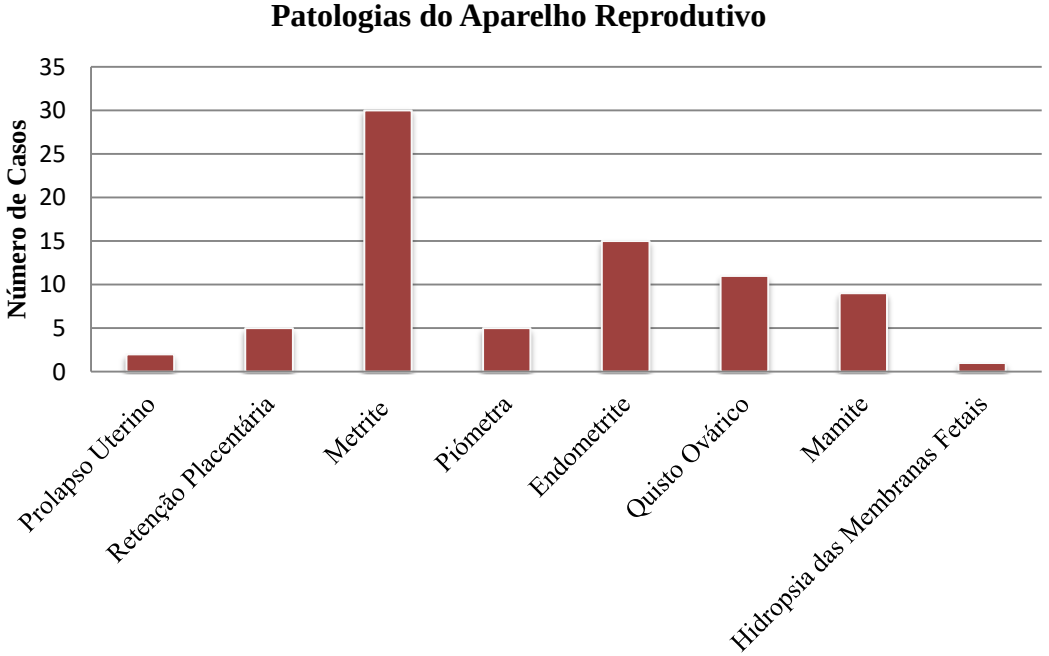
(Exemplo: Tuberculose, *Neospora caninum*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium* spp, BVD, BRSV, *Pasteurella*, Mamites, Paratuberculose…)

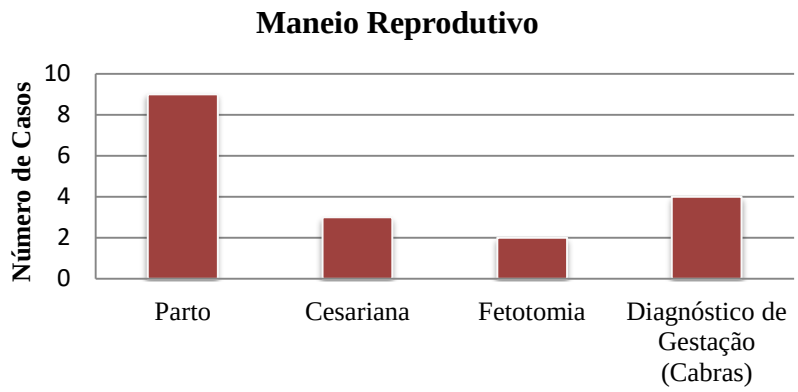
5.7. Programa Vacinal da exploração:

Casuística observada durante o período de estágio de 01 de Agosto de 2018 a 23 de Dezembro de 2018

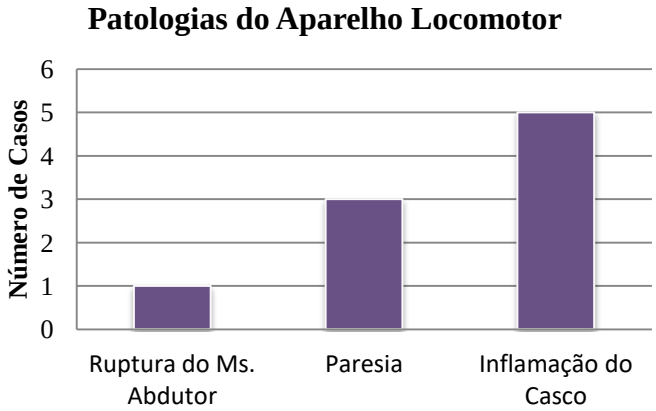


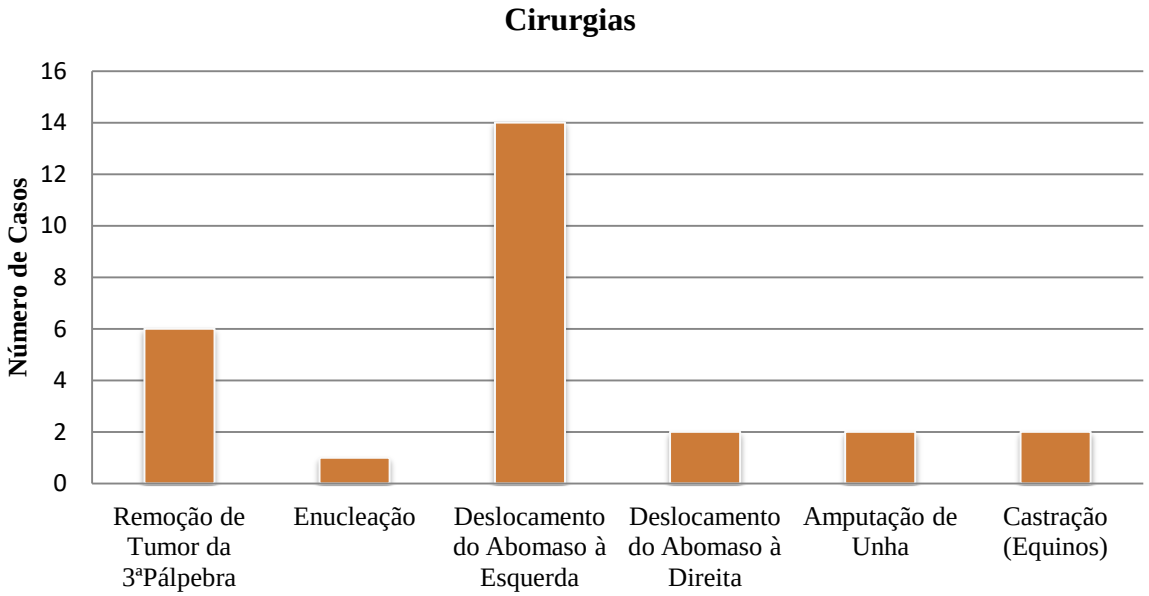






Nota: Em bovinos foram realizadas aproximadamente 1200 palpações/ecografias rectais para diagnóstico de gestação.





Outras situações:	
Remoção do Tronco do Encéfalo	7
Peritonite	3
Leptospirose em Cabra	2
Eutanásia	5
Vacinação	60