

Relatório Final de Estágio
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE RISCO E AVALIAÇÃO DE
PRÁTICAS DE BIOSSEGURANÇA EM EXPLORAÇÕES
PRODUTORAS DE LEITE**

João Miguel da Costa Pacheco

Orientador: João José Rato Niza Ribeiro

Co-orientadora: Adelaide do Rio Pereira

Porto 2010

Relatório Final de Estágio
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE RISCO E AVALIAÇÃO DE
PRÁTICAS DE BIOSSEGURANÇA EM EXPLORAÇÕES
PRODUTORAS DE LEITE**

João Miguel da Costa Pacheco

Orientador: João José Rato Niza Ribeiro
Co-orientadora: Adelaide do Rio Pereira

Porto 2010

Resumo

O interesse pela biossegurança tem aumentado ao longo dos últimos anos. A sua importância é tal que constitui uma das áreas chave do Plano Estratégico de Saúde Animal 2007-2013 da Comissão Europeia.

A Rinotraqueíte Infecciosa Bovina e a Diarreia Viral Bovina têm uma importância sanitária e económica a nível Mundial, conduzindo a perdas decorrentes da doença e a restrições ao movimento de animais.

Este trabalho foi realizado na Segalab – Laboratório de Sanidade Animal e Segurança Alimentar, S. A., tendo como objectivos obter uma ferramenta de avaliação do risco de IBR e BVD em explorações leiteiras, identificar factores de risco e avaliar práticas de biossegurança. Envolveu a construção de um questionário ao produtor e a visita a explorações aderentes ao programa de saúde animal Bovicontrol® para o seu preenchimento. Identificaram-se os factores de risco mais prevalentes e determinaram-se riscos relativos e *odds ratio* brutos, tendo-se encontrado como factores de risco significativos, com 95% de confiança, para IBR, a compra de animais sem exigir estatuto de indomne - $RR=2,0$ (1,17; 3,51) -, a não verificação de certificados sanitários na compra - $RR=1,7$ (1,05; 2,69) -, o não alojamento dos animais em lotes de acordo com a idade - $RR=1,7$ (1,35; 2,04) - e a presença de camas subdimensionadas ou desconfortáveis - $RR=1,7$ (1,09; 2,59); para BVD, a participação em feiras, exposições ou concursos - $RR=2,3$ (1,04; 5,01) -, a cobertura natural - $RR=2,5$ (1,16; 5,39) - e os efectivos com mais de 100 animais - $RR=5,0$ (1,23; 20,25).

Como pontos fracos da maioria das explorações, referem-se a proximidade a explorações vizinhas, a introdução de animais sem conhecimento do estado vacinal ou sanitário e sem fazer quarentena, a escassez de espaços destinados à recolha de animais, de pedilúvios para pessoas e de registos de entradas na exploração e a inexistência de rodilúvios. Como pontos fortes destacam-se a não utilização de pastos comunitários, a fraca possibilidade de contacto directo entre animais de diferentes explorações, o controlo de insectos e o alojamento dos animais em função do grupo etário.

Agradecimentos

Quero agradecer, em primeiro lugar, ao Professor Doutor João Niza Ribeiro, a oportunidade que me deu de estagiar na Segalab – Laboratório de Sanidade Animal e Segurança Alimentar, S. A. e toda a disponibilidade e empenho em contribuir para o sucesso do meu trabalho.

Em segundo lugar, quero agradecer à Dra. Adelaide Pereira a excelente orientação que me prestou durante todo o estágio, quer na parte de investigação e pesquisa bibliográfica, quer no trabalho de campo, partilhando comigo a sua vasta experiência na área da sanidade animal.

Muito obrigado também a todos os colaboradores da Segalab, em especial à Dra. Helena Madeira, à Dra. Carla Afonso, à Ana Marques, à Dra. Ana Lemos, ao Dr. João Sousa, ao Eng. Paulo Jardineiro, ao Jorge Carrapatoso e ao Alberto Matos.

Agradeço também a todos os meus amigos e colegas de curso, sem os quais nunca teria chegado a este ponto, em especial à madrinha Janokas, à Kuki, à Inês, ao João, à Sara, ao Jorge, à Joana, ao Garcia, à Cláudia, à Marta, à Tita, à Kiki, ao Manel e à Bianca.

Quero também agradecer aos meus familiares, especialmente aos meus primos Nano, Quina, Luís, Luci, Cristiano, Lúcia, Romain, Elsa, Joana, Paulo, Henrique, Ita, Cidália, Artur e Manel e aos meus tios e padrinhos, por todos os momentos passados ao longo da vida e por tudo aquilo que me deram e ensinaram.

Ao Alcides, pela ajuda na elaboração da base de dados.

Agradeço à Vanessa por todo o apoio que me deu durante os últimos anos do curso e durante a execução deste trabalho. Obrigado por toda a paciência. Mas, sobretudo, obrigado por tornar tão especiais todos os dias em que estamos juntos.

Dedico este trabalho aos meus pais e avós.

Índice

Resumo.....	ii
Agradecimentos.....	iii
Índice.....	iv
Lista de Abreviaturas.....	vi
1. Revisão Bibliográfica	1
1.1 Biossegurança em explorações leiteiras.....	1
1.2 A Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR).....	2
1.2.1 Introdução.....	2
1.2.2 Etiologia.....	3
1.2.3 Epidemiologia.....	3
1.2.4 Patogenia.....	4
1.2.5 Sinais clínicos.....	6
1.2.6 Diagnóstico.....	6
1.2.7 Vacinação e controlo.....	7
1.3 A Diarreia Viral Bovina (BVD).....	9
1.3.1 Introdução.....	9
1.3.2 Etiologia.....	9
1.3.3 Epidemiologia.....	10
1.3.4 Patogenia.....	10
1.3.5 Sinais clínicos.....	11
1.3.6 Diagnóstico.....	12
1.3.7 Vacinação e controlo.....	13
2. Trabalho Prático.....	14
2.1 Introdução e objectivos.....	14

2.2 Materiais e métodos.....	15
2.3 Resultados.....	17
2.3.1 Explorações seleccionadas.....	17
2.3.2 Classificação das explorações.....	17
2.3.3 Proximidade relativamente a outras explorações.....	17
2.3.4 Aquisição de animais.....	18
2.3.5 Maneio reprodutivo.....	18
2.3.6 Medidas de biossegurança relativas a visitantes e viaturas.....	19
2.3.7 Controlo de insectos e pragas.....	19
2.3.8 Práticas de vacinação.....	20
2.3.9 Práticas de higiene.....	20
2.3.10 Instalações.....	21
2.3.11 Maneio dos vitelos.....	22
2.3.12 Cuidados relativos a roupa e equipamento.....	22
2.3.13 Procedimentos perante casos de morte e aborto.....	23
2.3.14 Associações de risco.....	23
2.4 Discussão.....	23
3. Conclusão.....	26
4. Bibliografia.....	27
Anexo 1 – Questionário.....	a
Anexo 2 – Lista de Planos de Biossegurança.....	b
Anexo 3 – Tabelas e Gráficos.....	c
Anexo 4 – Medidas de Associação.....	f

Lista de Abreviaturas

BoHV1 – Herpesvírus Bovino tipo 1
BVD – Diarreia Viral Bovina
BVDV – Vírus da Diarreia Viral Bovina
cp – citopatogénico
DIVA – *Differentiating Infected from Vaccinated Animals*
ELISA – *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*
FA – *Fluorescent Antibody*
gB – glicoproteína B
gC – glicoproteína C
gE – glicoproteína E
HACCP – *Hazard Analysis and Critical Control Points*
IA – Inseminação artificial
IBP – Balanopostite Pustular Infecciosa
IBR – Rinotraqueíte Infecciosa Bovina
IC – Intervalo de confiança
IF - Imunofluorescência
IPV – Vulvovaginite Pustular Infecciosa
ncp – não citopatogénico
OR – *Odds ratio*
PCR – *Polymerase Chain Reaction*
PI – Persistentemente infectado
RR – Risco relativo
SNC – Sistema nervoso central
VNT – Teste de Neutralização Viral

1. Revisão Bibliográfica

1.1 Biossegurança em Explorações Leiteiras

Em todas as explorações leiteiras, grandes ou pequenas, o cuidado com a saúde dos animais e a prevenção de doenças representa, actualmente, uma componente maior das operações da exploração, logo atrás da alimentação, da genética e do controlo de qualidade (Noordhuizen & Jorritsma 2009).

Existem várias definições para o termo biossegurança, adaptadas a diferentes necessidades e fins. Por exemplo, a *National Association of State Departments of Agriculture* descreve a biossegurança como sendo um trabalho vital com vista a proteger a saúde animal e humana e o ambiente de perigos biológicos; o objectivo primário é minimizar os riscos associados às doenças e aos organismos; as ferramentas principais são a exclusão, a erradicação e o controlo, suportadas por sistemas de manejo especializados, por protocolos práticos e por uma rápida e eficiente partilha de informação (Gunn *et al* 2008). A biossegurança é, então, o resultado de todas as actividades tendo em vista evitar a introdução de agentes de doença numa determinada área, seja esta uma exploração individual ou mesmo um país, incluindo todos os níveis intermédios. O controlo das doenças presentes numa exploração é, por vezes, denominado por biocontenção (Dargatz *et al* 2002).

O interesse e a discussão em torno do tema da biossegurança têm aumentado grandemente nos últimos anos. Este facto fica a dever-se, em grande parte, à ocorrência de doenças como a Encefalopatia Espongiforme Bovina, no Reino Unido e a surtos de Febre Aftosa, um pouco por todo o Mundo. Outros factores que têm estimulado o interesse na biossegurança são as alterações demográficas nas práticas agrícolas, os agentes de doença considerados para o controlo e as preocupações acerca do uso de tecnologias de controlo de doenças na produção animal (Dargatz *et al* 2002), bem como a intensificação crescente da produção (Morley 2002). A utilização de agentes químicos no controlo das doenças e da produção tem, também, gerado preocupação, sendo desconhecido o papel que o uso de antimicrobianos em animais desempenha sobre a emergência de agentes patogénicos resistentes em medicina humana. Uma parte do conceito de uso responsável e criterioso destes agentes coloca ênfase na prevenção da ocorrência de doenças. Esta prevenção leva em conta a tríade epidemiológica da ocorrência de doença, que consiste na relação entre o hospedeiro, o agente patogénico e o meio ambiente. As actividades dirigidas ao aumento da imunidade do hospedeiro elevam a sua capacidade de resistir ao agente, caso seja exposto; as acções dirigidas ao agente visam, primariamente, limitar a sua capacidade infectante, diminuindo a exposição do hospedeiro ao agente; as acções sobre o meio ambiente têm como objectivo limitar a sobrevivência e a disseminação do agente nas instalações e equipamentos. Todas as

actividades descritas são componentes potenciais de um plano de biossegurança (Dargatz *et al* 2002).

Um benefício claro dos programas de saúde animal que incorporem os princípios da biossegurança é a redução dos custos resultantes das doenças e o aumento da produtividade e da proficuidade. Para além disso, a preocupação com a segurança alimentar e o desenvolvimento de sistemas de rastreabilidade podem constituir um incentivo para os produtores implementarem medidas de redução do risco, similarmente aos programas HACCP (*Hazard Analysis and Critical Control Points*) usados na indústria alimentar. Estes esforços são particularmente importantes para os produtores que buscam novos mercados para os seus animais ou produtos de origem animal (Dargatz *et al* 2002).

Nas explorações produtoras de leite, os factores gerais a considerar quando se pretende implementar práticas de biossegurança são a proximidade relativamente a outras explorações, o estado de saúde dos animais introduzidos na exploração, a qualidade da alimentação e da água, o risco associado ao contacto com animais domésticos de outras espécies e silvestres, o papel dos equipamentos na disseminação de doenças dentro e entre explorações, o risco interposto por visitantes, técnicos e respectivas viaturas, os veículos de transporte de animais, o maneio dos lotes de animais, o controlo do tráfego de pessoas e viaturas dentro da exploração e a higiene das instalações, entre outros (Dargatz *et al* 2002, Noordhuizen & Jorritsma 2009).

1.2 A Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR)

1.2.1 Introdução

No séc. XIX, era descrita, na Alemanha, uma doença dos bovinos, provavelmente causada pelo Herpesvirus Bovino tipo I (BoHV-1), e designada por “exantema vesicular coital”. As manifestações clínicas das infecções por BoHV-1 mantiveram-se confinadas aos órgãos genitais até ao início da década de 1950, sendo conhecidas como Vulvovaginite Pustular Infecciosa (IPV) nas vacas e Balanopostite Pustular Infecciosa (IBP) nos touros. Nesta altura, uma forma respiratória da infecção surgiu em lotes de engorda na América do Norte, tendo tomado a designação de Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (Gibbs & Rweyemamu 1977). Esta nova forma, mais conhecida por IBR, rapidamente se disseminou para a Europa através das importações de bovinos de leite. Actualmente, considera-se o BoHV-1 responsável por perdas económicas significativas decorrentes da doença e de restrições ao movimento de animais (Bowland & Shewen 2000).

1.2.2 Etiologia

O BoHV-1 é um dos 17 membros do género *Varicellovirus*, pertencente à subfamília *Alphaherpesvirinae* e é um dos oito herpesvirus isolados até agora de bovinos infectados naturalmente. Todos os vírus isolados pertencem a uma única estirpe viral e são classificados em três subtipos - BoHV-1.1, BoHV-1.2a e BoHV-1.2b., sendo a análise do DNA viral o único critério fiável de distinção (Muylkens *et al.* 2007).

O BoHV-1 apresenta uma cápside icosaédrica. As glicoproteínas são importantes para a patogenicidade e para as interacções do vírus com o hospedeiro, designadamente a indução da resposta imunitária. O BoHV-1 caracteriza-se pela rápida replicação e lise das células infectadas e pela capacidade de estabelecer infecção latente, principalmente, mas não exclusivamente, nos neurónios e possui um leque alargado de hospedeiros (Muylkens *et al.* 2007).

O vírus é estável a valores de pH entre 6.0 e 9.0, sendo capaz de resistir no meio ambiente até um mês (no Inverno) e, no interior dos estábulos, entre 6 a 13 dias, no Inverno, e 5 a 9 dias no Verão. A sobrevivência é máxima quando existem baixas temperaturas e elevada humidade relativa (Straub 1990).

1.2.3 Epidemiologia

O BoHV-1 encontra-se disseminado por todo o Mundo, apresentando variações significativas de incidência e prevalência nas diferentes regiões (Ackermann & Engels 2006). Os factores de risco da infecção por BoHV-1 estão bem caracterizados: idade, sexo (os machos apresentam-se mais frequentemente seropositivos do que as fêmeas), tamanho do efectivo (Dannacher *et al.* 1985), contacto directo entre animais, compra de animais e participação em exposições e feiras de gado (Dannacher *et al.* 1985; Lemaire *et al.* 1994). Apesar de a transmissão se efectuar, preferencialmente, através do contacto directo entre os animais, a transmissão por aerossóis também se provou ser possível, pelo menos a curtas distâncias (Lemaire *et al.* 1994; Muylkens *et al.* 2007). A densidade animal pode também aumentar o risco de disseminação de BoHV-1 na exploração (Gibbs & Rweyemamu 1977). A infecção genital pode ocorrer por contacto directo durante a cobrição, através de sémen contaminado (Lemaire *et al.* 1994; Muylkens *et al.* 2007) ou ainda a partir da contaminação através da cauda de um animal vizinho infectado. O sémen congelado constitui igualmente um risco. Apesar de o BoHV-1 ter sido isolado no leite e nas fezes de animais infectados (Muylkens *et al.* 2007) e de ter sido observada seroconversão em vitelos alimentados com leite de uma vaca que evidenciava uma reactivação, nenhuma destas fontes é considerada uma via de infecção significativa em situações de campo (Lemaire *et al.* 1994).

Os visitantes, médicos veterinários, técnicos de inseminação artificial e todo o restante pessoal técnico e o seu equipamento demonstraram ser factores de risco para a introdução de BoHV-1 na exploração (Lemaire *et al.* 1994).

Tal como acontece com infecções por outros Herpesvírus em animais e no Homem, a latência e reactivação da infecção tem um forte impacto epidemiológico, uma vez que é responsável pela manutenção da infecção num efectivo. A infecção de novos animais por portadores latentes submetidos a reactivação pode ocorrer em variadas ocasiões, nomeadamente aquando do parto, na cobertura, durante o transporte ou após a introdução de novilhas no grupo das vacas em lactação (Lemaire *et al.* 1994, Muylkens *et al.* 2007). Por conseguinte, a identificação de portadores latentes é uma preocupação quando se pretende implementar um programa de controlo de BoHV-1. De referir que a duração da excreção e o título de vírus excretado são inferiores numa infecção latente que sofre reactivação do que numa infecção primária (Muylkens *et al.* 2007).

Uma outra preocupação dos esquemas de erradicação de IBR reside na capacidade do vírus atravessar a barreira da espécie, sendo do conhecimento que o BoHV-1 pode infectar diversas espécies de ruminantes, incluindo as ovelhas. Contudo, não existem, até à data, dados que permitam confirmar estas espécies como um reservatório alternativo da doença (Engels & Ackermann 1996). Alguns autores defendem que a implementação de medidas de controlo e de vacinação das espécies de pequenos ruminantes poderia contribuir para um controlo eficiente da infecção por BoHV-1 (Thiry *et al.* 2008). O BoHV-1 já foi isolado numa carraça da espécie *Ornithodoros coriaceus*; esta pode hospedar o agente por um longo período de tempo, durante o qual a replicação pode ocorrer; este achado torna possível a transmissão mecânica da virose (Straub 1990).

A taxa de morbilidade varia segundo a literatura consultada, apresentando valores entre os 20 e os 100%. Todavia, todos concordam que a taxa de mortalidade depende de factores externos tais como o crescimento, alimentação, clima e condições higiénicas. Geralmente, a taxa de mortalidade apresenta valores de 1-12% (2-10%; 7-8%; 8-12%; 1-10%) (Straub 1990).

1.2.4 Patogenia

As vias naturais de entrada do BoHV-1 são as mucosas dos tratos respiratório superior e genital. No interior das células epiteliais, o vírus inicia o ciclo lítico de replicação, que conduz à morte da célula. Além do efeito citopático do vírus, o BoHV-1 também reduz a reparação do epitélio respiratório. A replicação no local de entrada produz quantidades massivas do vírus, que é eliminado nas secreções nasais com títulos elevados, normalmente, durante as duas primeiras semanas pós-infecção (Gibbs & Rweyemamu 1977) e, desta forma, disseminado por todo o efectivo (Muylkens *et al.* 2007). O vírus dissemina-se no organismo por virémia e, eventualmente, por invasão neuronal (Engels & Ackermann 1996).

Existem duas formas de dispersão local do vírus. Uma envolve a interacção do envelope viral com os receptores das células susceptíveis e a outra consiste na disseminação directa do vírus célula a célula. Esta última é especialmente vantajosa para o vírus porque ocorre na presença de anticorpos neutralizantes (Muylkens *et al.* 2007).

A infecção primária provoca uma virémia transitória, com localizações secundárias noutros órgãos, principalmente no tracto digestivo, feto, ovários, glândula mamária, cérebro, rins e gânglios linfáticos mesentéricos (Lemaire *et al.* 1994).

O vírus multiplica-se nas mucosas, penetra nos nervos periféricos e atinge o gânglio nervoso regional (gânglio trigémio, na infecção respiratória, e gânglio sacral, na infecção genital), onde se instala no estado latente.

Após infecção por BoHV-1, desenvolve-se primeiro uma resposta imune celular não específica, seguida pela resposta celular específica, a partir do 5º dia pós-infecção e atinge um pico entre os dias 7 e 10, geralmente coincidindo com a recuperação dos sinais clínicos. Após o dia 10 pós infecção, torna-se detectável a resposta humoral específica, que impede a dispersão extra-celular do vírus. Esta resposta humoral é de extrema importância na prevenção de infecções secundárias, limitando ainda as consequências de uma reactivação (Muylkens *et al.* 2007). A imunidade passiva conferida pelo colostro de vacas imunizadas protege os neonatos da doença sistémica e letal (Lemaire *et al.* 1994).

Após infecção, o vírus estabelece-se de forma latente para a vida em neurónios sensitivos do sistema nervoso periférico. Os macrófagos e as células epiteliais poderiam constituir igualmente locais de latência (Lemaire *et al.* 1994). Especula-se que existam estratégias de evasão imune desempenhando um papel no estabelecimento da infecção persistente por BoHV-1 (Muylkens *et al.* 2007). A reactivação pode ser natural ou ocorrer depois de tratamento com corticoesteróides (Lemaire *et al.* 1994), acompanhando-se da eliminação do vírus sem manifestações clínicas, que é transmitido a animais susceptíveis. Uma vez reactivado no gânglio nervoso, o vírus pode ser re-excretado ou não, conforme o estado imune do animal e o fenótipo do vírus. A resposta imune primária decorrente da exposição natural ao vírus ou da vacinação é capaz de controlar com sucesso a re-excreção. Animais apresentando um título elevado de anticorpos neutralizantes não irão eliminar o vírus após qualquer estímulo eficaz de reactivação (Muylkens *et al.* 2007). A exposição a estímulos de reactivação sucessivos é também efectiva na inibição da re-excreção viral. Deste modo, não é espectável que a reactivação nos dois meses após a infecção primária dê origem a uma re-excreção. Mutantes BoHV-1 sem glicoproteína C (gC) e sem glicoproteína E (gE) estabelecem latência mas não sofrem re-excreção após reactivação. Por outro lado, vários mutantes BoHV-1 sem gE obtidos de estirpes virulentas foram re-excretados. No entanto, comparativamente com vitelos infectados com a estirpe selvagem do vírus, uma menor proporção dos animais

infectados com o vírus mutado apresentou excreção, tendo-se ainda observado um atraso de três dias no período de re-excreção (Muylkens *et al.* 2007).

1.2.5 Sinais clínicos

A severidade da doença causada por BoHV-1 depende de diversos factores, incluindo a virulência da estirpe, dose infectante, imunidade e idade do animal e infecções bacterianas concorrentes. A doença subclínica está relacionada com a estirpe de baixa virulência (Kaashoek *et al.* 1996) ou com a imunização passiva através do colostro, em regiões onde a doença é endémica (Lemaire *et al.* 1994).

O período de incubação é de 2 a 4 dias, dependendo do grau de exposição; alguns autores referem 3 a 7 dias podendo prolongar-se até aos 20 dias (Blood & Radostis 1989). Os animais apresentam febre por 4 a 5 dias, apatia, anorexia, queda significativa da produção, descarga nasal mucopurulenta, estridor inspiratório em casos severos e tosse (Muylkens *et al.* 2007).

Cerca de 25% das fêmeas gestantes susceptíveis podem abortar após um surto de IBR. As vacas gestantes podem abortar no decorrer de qualquer forma clínica da doença ou mesmo após uma infecção subclínica. O comportamento das vacas que abortam mantém-se quase inalterado, apenas se verificando diminuição da produção de leite (EFSA 2006). Até agora, apenas os tipos 1.1 e 1.2a demonstraram ter potencial abortivo (Muylkens *et al.* 2007).

Os vitelos com menos de 6 meses podem desenvolver encefalite (também observada em animais adultos). Nos animais recém-nascidos observa-se a forma sistémica da doença, altamente fatal (Muylkens *et al.* 2007).

A forma genital da doença, conhecida por IPV nas fêmeas e IBP nos machos, normalmente fica confinada aos órgãos genitais, podendo infecções mais severas conduzir a orquite no touro e endometrite na vaca (Gibbs & Rweyemamu 1977).

O vírus foi já isolado em fezes de bovinos adultos com IBR apresentando, ou não, diarreia. Esta surge com mais frequência como sintoma da forma generalizada da doença, nos vitelos (Straub 1990).

1.2.6 Diagnóstico

Pode suspeitar-se de uma infecção pelo BoHV-1 com base em sinais clínicos. Contudo, o diagnóstico definitivo requer sempre uma confirmação laboratorial.

O BoHV-1 pode ser isolado a partir de secreções nasais ou genitais colhidas durante a fase aguda da infecção e a partir de vários órgãos colhidos *post-mortem* (nomeadamente a placenta, juntamente com as carúnculas). Para a detecção do antigénio viral, além das culturas celulares, utilizam-se as técnicas de Imunofluorescência (IF) e a técnica de *polymerase chain reaction* (PCR), esta cada vez mais frequente em testes diagnósticos de rotina (OIE 2008).

Durante o estado de latência, não é possível o isolamento do vírus e nenhum antígeno viral pode ser demonstrado. Contudo, é possível a demonstração do DNA viral nos gânglios trigémio ou sacral (EFSA 2006).

Os testes serológicos dividem-se em convencionais e marcados. Apenas métodos de ELISA competitivos (detecção de anticorpos anti-gE) estão disponíveis como testes marcados. Como métodos de serologia convencional existem testes de neutralização viral (VNT) e métodos de ELISA directos (detecção de anticorpos anti-gB) e indirectos. A realização de testes ELISA em amostras de leite do tanque refrigerado pode fornecer uma estimativa da prevalência do vírus numa exploração ou em determinada região, devendo ser complementados com testes realizados em amostras de soro (OIE 2008). Um estudo recente concluiu que os testes de neutralização viral e os ELISA-gB são os mais sensíveis para a detecção de anticorpos no soro e que os ELISA indirectos são os mais sensíveis para a detecção de anticorpos no leite. A detecção de portadores latentes é baseada, normalmente, na detecção de anticorpos específicos. Um aumento de quatro vezes no título de anticorpos anti-BoHV-1 indica que ocorreu uma reactivação alguns dias antes (EFSA 2006) mas não ocorre em todos os casos. A imunidade colostrar pode interferir com a resposta humoral à infecção. É necessário o desenvolvimento de outros meios de diagnóstico que permitam identificar portadores latentes, sendo a identificação do vírus por PCR a partir de amostras das tonsilas faríngeas uma possível e útil alternativa (Muylkens *et al.* 2007).

1.2.7 Vacinação e controlo

As estratégias de controlo das infecções causadas por BoHV-1 permitiram, nas últimas décadas, reduzir o impacto clínico da doença. No entanto, ainda se torna difícil controlar a transmissão do vírus, principalmente devido à existência dos portadores latentes.

O controlo e a erradicação do BoHV-1, na Europa, iniciaram-se no início da década de 80, numa base voluntária ou compulsiva, conforme os países. Países como a Dinamarca, Suécia, Finlândia e Áustria implementaram uma política de identificação e abate (EFSA 2006) e conseguiram já erradicar a doença, o mesmo se aplicando à província italiana de Bolzano (Decisão da Comissão 2004/558/CE). Na Alemanha, foi implementado um programa de vacinação para reduzir a prevalência e limitar a disseminação do vírus. Em França, a primeira tentativa de controlo e/ou erradicação da doença teve lugar em certas regiões como a Bretanha, em regime voluntário, tendo consistido na vacinação de efectivos infectados (EFSA 2006). Além da Alemanha, também Itália e República Checa têm actualmente programas de erradicação em curso (Decisão da Comissão 2008/233/CE).

As medidas de controlo incluem a) identificação de animais positivos para gE e a sua inclusão na lista para refugo; b) vacinação do efectivo com vacina gE marcada; c) controlo das aquisições de animais com testes à entrada, quarentena e, quando possível, certificados de

origem; d) evitar contacto com animais de outras explorações e a sua deslocação a feiras, concursos ou exposições; e) controlar as entradas de pessoas e veículos na exploração e implementar medidas de biossegurança; f) implementar medidas de higiene adequadas.

A maioria das vacinas é eficaz na prevenção dos sinais clínicos decorrentes da infecção e da re-excreção do vírus por animais infectados de forma latente mas nenhuma é totalmente capaz de prevenir a infecção. Assim, os programas de controlo do BoHV-1 podem manter-se durante longos períodos de tempo até se completar a erradicação desta, bem adaptada, infecção. Se a prevalência de indivíduos latentes na exploração for baixa, é mais seguro fazer o seu refugio (Muylkens *et al.* 2007).

Existem diversos tipos de vacinas frente ao BoHV-1, nomeadamente as vivas modificadas, as inactivadas, as baseadas em subunidades, as vacinas de DNA e as marcadas (Ackermann & Engels 2006). A protecção conferida pela vacina é de cerca de 6 meses (Strube *et al.* 1996). Diversos países europeus como Itália, França e Alemanha iniciaram programas de erradicação de IBR baseados na utilização de vacinas DIVA (*Differentiating Infected from Vaccinated Animals*), que não expressam o gene para a gE e permitem a diferenciação dos animais vacinados dos naturalmente infectados (EFSA 2006).

Apesar da eficácia demonstrada das vacinas DIVA, o seu uso apresenta também inconvenientes. Em primeiro lugar, a sensibilidade do único teste ELISA disponível é apenas 70%, o que conduz ao aparecimento de 30% de falsos negativos (considerada suficiente para garantir uma elevada sensibilidade ao nível de efectivos infectados). Em segundo lugar, a resposta imune contra a gE é fraca, podendo atrasar a detecção dos anticorpos em 42 dias (Muylkens *et al.* 2007). Por fim, refiram-se ainda dois problemas de segurança relacionados com o uso das vacinas DIVA atenuadas: a capacidade de estabelecerem infecção latente (e serem eliminadas sob estimulação natural ou experimental) e o potencial aparecimento de recombinantes entre a estirpe vacinal e a estirpe de campo (Ackermann & Engels 2006). Ainda assim, não existem indicações de que o vírus vacinal se perpetue na população (EFSA 2006).

Novas formulações e protocolos vacinais têm sido desenvolvidos para determinar a forma mais eficaz de prevenir a excreção e re-excreção de BoHV-1. Bosch *et al.* (1996) concluíram que uma vacina marcada atenuada, quando administrada duas vezes a um efectivo seronegativo, induz uma maior protecção virológica do que a vacina marcada inactivada (Muylkens *et al.* 2007); por sua vez, a vacina inactivada mostrou-se mais eficaz na redução da excreção viral após reactivação de uma infecção latente do que a vacina atenuada (Bosch *et al.* 1997). A aplicação de uma primeira injeção com a vacina atenuada seguida por um reforço vacinal utilizando a vacina inactivada mostrou ser uma combinação eficaz na redução da excreção viral após infecção, sendo um protocolo interessante (Muylkens *et al.* 2007). Quer a administração intranasal, quer a intramuscular, de uma vacina atenuada, induz imunidade após 2 a 3 dias (Van Oirschot *et al.* 1996).

1.3 A Diarreia Viral Bovina/Doença das Mucosas (BVD/MD)

1.3.1 Introdução

A Diarreia Viral Bovina (BVD) é um complexo de patologias associado à infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV), tendo emergido como uma das mais importantes doenças dos bovinos e tendo conduzido a perdas económicas substanciais, quer na indústria de carne, quer na indústria leiteira, por todo o Mundo (Grooms 2004, Fourrichon *et al.* 2005). Ao contrário do que o seu nome poderia fazer pensar, o BVDV é responsável por manifestações em diversos sistemas fisiológicos para além do digestivo, nomeadamente o respiratório, reprodutivo, circulatório, linfático, músculo-esquelético e nervoso. As perdas reprodutivas relacionadas com o BVDV parecem ser as economicamente mais significativas. Além de reduzir a eficiência reprodutiva, o BVDV serve-se do sistema reprodutivo para se manter e se disseminar no efectivo, induzindo imunotolerância após a infecção fetal, resultando no nascimento de vitelos persistentemente infectados (PI), que são a principal fonte de transmissão do vírus dentro e entre explorações (Grooms 2004).

1.3.2 Etiologia

O BVDV é um vírus RNA, de cadeia simples, pertencente à família *Flaviviridae* e ao género *Pestivirus*, do qual fazem parte também o vírus da cólera suína e o vírus da *Border Disease* (Kelling 2004). A infecciosidade dos pestivírus fora do hospedeiro é de curta duração (Liess 1990), resistindo menos de 10 dias no estrume. São inactivados na presença de solventes orgânicos, soda cáustica e formol e quando expostos a valores de pH fora do intervalo de 5,7 a 9,3 (Fenner *et al.* 1993, Brand *et al.* 1996, Tremblay 1996).

Existem dois biótipos do vírus, o citopatogénico (BVDVcp) capaz de induzir fenómenos de vacuolização e lise em culturas celulares e o não citopatogénico (BVDVncp). Os isolados BVDVncp são mais prevalentes na natureza do que os BVDVcp (Kelling 2004). Ambos os biótipos de BVDV causam doença, mas apenas o ncp é responsável por infecções *in útero* e causa infecções persistentes (Brownlie 2002). A doença das mucosas ocorre quando se combinam estirpes de BVDVcp e ncp no mesmo animal (Baker 1987, Roeder & Harkness 1986). Genotipicamente, foram caracterizados 2 grupos: o BVDV tipo 1 inclui as estirpes classicamente isoladas, usadas como estirpes de referência em laboratórios e em vacinas (Ridpath *et al.* 2005); o BVDV tipo 2 compreende sobretudo estirpes associadas a infecções agudas de elevada mortalidade. As infecções clinicamente severas e agudas foram causadas pelo BVDV tipo 2 ncp (Ridpath *et al.* 2005, Cortese *et al.* 1996). Actualmente estão descritos, pelo menos, 11 subgenótipos dentro do grupo BVDV tipo 1 (Vilcek *et al.* 2001)

1.3.3 Epidemiologia

As infecções pelo BVDV são endémicas nas populações de bovinos a nível mundial, atingindo prevalências de 1-2% de animais PI e 60-85% de animais seropositivos (Houe 1999).

A elevada prevalência em combinação com os efeitos negativos na reprodução e na saúde geral dos efectivos onde a infecção está presente resulta em perdas económicas significativas (Fredriksen *et al.* 1998, Houe 2003), que podem variar entre os 30 € e os 100 € por vaca, por ano.

O BVDV é eliminado no leite, saliva, urina, fezes, secreções oculares e nasais e no sémen. Transmite-se horizontalmente, quer pelo contacto directo entre animais infectados e susceptíveis, quer por intermédio de materiais infectados veiculados por pessoas, alimentos ou outros. A reutilização de agulhas ou de luvas de palpação rectal, o uso de vacinas vivas ou contaminadas e a transmissão por insectos hematófagos foram demonstradas e estão documentadas (Gunn 1993). O vírus transmite-se verticalmente, infectando embriões e fetos por via transplacentária e vitelos por ingestão de leite ou colostro de vacas infectadas.

As principais e mais importantes fontes de infecção são os animais persistentemente infectados (PI), uma vez que eliminam continuamente grandes quantidades do agente no ambiente. Os bovinos com infecção aguda, bem como outros ruminantes, aguda ou persistentemente infectados, podem também transmitir o vírus, embora de forma menos eficiente; está documentada a transmissão viral entre ovelhas e vacas (Houe 1999). O BVDV é excretado no sémen de touros com infecção aguda e, em quantidades muito superiores, no sémen de touros PI (Givens & Waldrop 2004). A possibilidade de transmissão por via aérea é admitida por alguns autores (Mars *et al.* 1999).

As diferenças de prevalência entre as diferentes regiões explicam-se por diferenças na densidade animal, no sistema de produção e nas práticas de manejo e de comércio de animais (Houe 1999, Lindberg & Houe 2005). Em sistemas intensivos, um só vitelo PI pode infectar mais de 90% do restante efectivo até atingir os 3-4 meses de idade (Houe 1999). Um atraso na transmissão do vírus dentro do efectivo é observado quando os animais são mantidos em edifícios ou compartimentos separados, consoante a idade e fase de produção (Houe 1999).

1.3.4 Patogenia

Após inalação ou ingestão de secreções de animais infectados, o vírus replica-se nas tonsilas, tecido linfóide e epitélio da orofaringe, podendo ser isolado do sangue 3 a 10 dias após a infecção (Brownlie 2002). Os anticorpos em circulação neutralizam o vírus, promovem a sua eliminação e previnem a sua chegada aos órgãos-alvo e ao feto. A imunidade celular é importante para a resolução de infecções agudas pelo biotipo ncp (Kelling 2004).

O BVDV é capaz de debilitar o sistema imune durante uma infecção aguda, por vezes conduzindo à co-infecção com outros agentes como BoHV-1, *Rotavirus*, *Coronavirus*,

Pasteurella haemolytica e *Salmonella spp.* A imunossupressão conducente às co-infecções é o resultado de uma leucopenia transitória e, possivelmente, de uma disfunção neutrofílica (Brownlie 2002). Regra geral, apenas em animais não imunizados o vírus é capaz de invadir o placentoma e se replicar no trofoblasto, atingindo depois o feto. O intervalo de tempo desde a infecção até à ocorrência de aborto pode variar de 10 dias até vários meses (Brownlie 2002). Além dos abortos, a infecção transplacentária com BVDV é responsável também por morte embrionária precoce, malformações congénitas, formação de vitelos PI, infertilidade e aumento do número de vacas repetidoras no efectivo.

A doença das mucosas ocorre quando um animal PI, resultante da infecção transplacentária com uma estirpe de BVDVncp, sofre uma super-infecção com uma estirpe homóloga do biótipo cp do vírus (Brugère-Picoux 1989). Esta forma da doença normalmente afecta animais dos 6 aos 18 meses mas já foi observada em adultos de 5 a 10 anos de idade.

O BVDV possui tropismo para as linhas celulares germinativas de ambos os sexos, tendo sido demonstrado no sémen e em folículos ovários (Grooms 2004).

1.3.5 Sinais Clínicos

A maioria dos animais susceptíveis, quando expostos ao vírus, evidencia uma infecção transitória, caracterizada por um quadro moderado ou inaparente e desenvolve uma resposta imune, eliminando o vírus (Fredriksen *et al.* 1999). Contudo, a BVD tem sido associada a surtos de elevada mortalidade, taxas de concepção reduzidas, abortos, malformações congénitas, nascimento de vitelos PI, hemorragia trombocitopénica, imunossupressão e infecção concomitante com agentes respiratórios e *Salmonella spp* (Roeder & Harkness 1986, Dubovi 1994, Kelling 2004). O conjunto de sinais exibidos pelos animais depende da sua imunidade e do genótipo do vírus envolvido (Bolin & Grooms 2004).

A infecção transplacentária resulta numa variedade de manifestações, conforme a fase da gestação em que ocorre a infecção (Roeder & Harkness 1986). Com efeito, uma infecção durante a fase embrionária (nos primeiros 45 dias) pode afectar as taxas de concepção e aumentar o número de vacas repetidoras no efectivo (Grooms 2004). Se a infecção ocorrer entre os dias 45 e 125 de gestação, a principal consequência é a geração de vitelos imunotolerantes (PI), podendo também ocorrer aborto ou malformações do sistema nervoso central (Brugère-Picoux 1989). As manifestações clínicas de um animal PI incluem baixa performance, imunossupressão, morbilidade e mortalidade elevadas e doença das mucosas, aguda ou crónica. Todos os vitelos nascidos de vacas PI são também PI. O feto começa a desenvolver imunocompetência entre os dias 125 e 175, tendo uma infecção nesta fase como consequência aborto ou malformações congénitas. A infecção após o dia 175 de gestação, quando o feto é já imunocompetente, pode resultar em aborto ou nascimento de um vitelo fraco (Dubovi 1994), podendo ser identificada através da detecção pré-colostral de anticorpos.

A doença das mucosas é uma condição fatal dos bovinos, caracterizada por um quadro erosivo severo das mucosas oral e intestinal. O aparecimento dos sinais clínicos é rápido, podendo, no entanto, ocorrer formas crónicas e debilitantes da doença (Brownlie 2002).

1.3.6 Diagnóstico

A maioria dos casos de infecção pelo BVDV caracteriza-se por quadros clínicos vagos, insuficientes para estabelecer um diagnóstico fiável. Para um correcto diagnóstico da presença do BVDV, bem como para obter estudos de prevalência, é necessária a análise laboratorial de amostras de leite e/ou soro (Sandvik 1999, Dubovi 1996, Saliki & Dubovi 2004).

Numa população não vacinada onde o BVDV é prevalente, podemos encontrar diferentes categorias de animais (tabela 1). A existência destas categorias deve ser reconhecida, uma vez que podem contribuir, para além dos animais PI, para a manutenção do vírus nos efectivos. Adicionalmente, a identificação fidedigna de efectivos não infectados e de animais imunes é importante para os excluir de testagens desnecessárias, aumentando assim o valor preditivo dos resultados quando se testam efectivos na sua totalidade (Sandvik 1999).

Tabela 1 – Categorias de animais numa população onde o BVDV é prevalente e resultados esperados dos testes de anticorpo e antigénio no soro (Adaptado de Sandvik 1999).

Categoria	Anticorpo	Antigénio	Comentário
Animal não infectado e não imune	-	-	
Animal virémico transitório	-	+/-	Título de vírus baixo e de curta duração
Animal imune após infecção aguda	+	-	
Vitelo com imunidade passiva	+	-	Anticorpos detectáveis durante 5-9 meses
Animal PI	-	+	
Vitelo PI de progenitora imune	+	-/+	Anticorpos detectáveis durante 4-10 semanas
Animal com doença das mucosas	-/+	+/-	Anticorpos neutralizantes
Vaca gestante de vitelo PI	+/++	-	Título elevado de anticorpos no final da gestação
Touro imune	+	-	O sémen pode conter o vírus

A identificação das explorações com animais PI é o objectivo principal do diagnóstico da BVDV. Nesse sentido, a pesquisa de anticorpos no leite é um método útil para identificar efectivos suspeitos (Ribeiro & Pereira 2004). Num estudo levado a cabo na região do Entre Douro e Minho, em Portugal, utilizando amostras de leite do tanque, foram obtidas 35% de explorações positivas, 25% de explorações negativas e 39% de resultados inconclusivos. Nesse estudo, estimou-se uma prevalência de BVDV nas explorações da região de 10%, partindo da relação existente entre o título de anticorpos no tanque de leite e a probabilidade da presença de animais PI na exploração (Niza-Ribeiro *et al.* 2005).

Alternativamente, a pesquisa de anticorpos no sangue de animais de determinadas idades fornece informação relativamente ao momento em que o efectivo se infectou. Métodos ELISA para detecção de anticorpos dirigidos contra a proteína NS 2/3 (P80), quer no soro, quer no leite, permitem a distinção entre animais com anticorpos vacinais e animais com infecções prévias com BVDV.

A técnica de amplificação de genes *in vitro* foi já usada para a detecção de ácidos nucleicos virais no leite. Esta técnica pode ser usada em efectivos vacinados mas só é aplicável a animais em lactação (Sandvik 1999).

Para investigações subsequentes de efectivos contendo animais PI, amostras de sangue dos animais da exploração são o melhor material para análise laboratorial. O critério para o diagnóstico de infecção persistente pelo BVDV é o isolamento repetido do vírus em amostras de sangue com 3 a 4 semanas de intervalo entre colheitas, sem que tenha ocorrido seroconversão. Para verificar que todos os PI foram removidos do efectivo, testam-se para anticorpos todos os animais com 8 a 12 meses de idade, pois estes animais encontram-se livres de anticorpos maternos e estiveram já em risco de contrair infecção aguda durante algum tempo (Sandvik 1999). Os testes de diagnóstico disponíveis e mais adequados para cada situação clínica estão listados na tabela 2.

Tabela 2 – Testes laboratoriais recomendados para o diagnóstico de BVD em situações clínicas específicas (Dubovi 1996).

Situação clínica	Teste de diagnóstico
Suspeita de infecção persistente	Isolamento viral; PCR (soro ou leite); Isolamento viral em microplaca (rastreo do efectivo); Teste de captura de antígeno (rastreo do efectivo);
Doença das mucosas	Isolamento viral; Imunohistoquímica; Fixação de FA para antígeno; PCR
Infecção aguda (em animais vivos)	Isolamento viral; PCR; Neutralização viral
Infecção aguda (em cadáveres)	Isolamento viral; PCR; Fixação de FA para antígeno; Imunohistoquímica
Vacas que abortaram	Isolamento viral; PCR; Neutralização viral

1.3.7 Vacinação e Controlo

O reconhecimento da existência de infecções persistentes pelo BVDV foi um dos mais importantes acontecimentos que contribuíram para o desenvolvimento das estratégias de prevenção e controlo desta doença.

A Dinamarca, Suécia, Finlândia, Noruega e Áustria conseguiram já erradicar a BVD sem recurso a vacinação (Lindberg & Alenius 1999, Sandvik 2004), enquanto que França,

Alemanha, Eslovénia, Holanda e Itália têm em curso programas de controlo de âmbito regional ou nacional (Sandvik 2004). A Islândia encontra-se livre da doença (OIE 2009).

O êxito de um programa de controlo do BVDV depende da correcta identificação e eliminação dos animais PI. O principal objectivo das medidas de controlo, a nível das explorações, é a prevenção de novas ocorrências de formas persistentes da BVD, porque as vacas PI podem manter-se clinicamente normais durante anos, reproduzindo-se com sucesso e a sua prole pode parecer normal mas trata-se, invariavelmente, de animais PI. Assim, estabelece-se uma “família virémica” capaz de persistir por várias gerações, e que constitui um dos mecanismos mais importantes de persistência do vírus da BVD numa exploração. Este cenário epidemiológico exige, principalmente a) a identificação e eliminação dos bovinos com infecção persistente; b) controlar todas as aquisições de animais (incluindo fetos), com testes serológicos à entrada e, se possível, certificados de origem e quarentena; c) controlar as aquisições de sémen e de embriões; d) evitar o contacto com bovinos de outras explorações e com outros animais assim como a sua deslocação a feiras, concursos ou exposições; e) controlar e implementar medidas de biossegurança nas entradas de pessoas e veículos; f) implementar medidas de higiene adequadas e planos de desinsectização (Lindberg & Alenius 1999, Gunn 1993, Houe 1999, Smith & Grotelueschen 2004, Lindberg & Houe 2005). A monitorização das explorações deve ser implementada numa base periódica, com recurso a testes laboratoriais que permitam demonstrar a contínua ausência de circulação do vírus e detectar precocemente a sua entrada, se falharem as medidas preventivas.

Um programa vacinal deve, principalmente, prevenir a infecção do feto, o que é mais difícil de conseguir do que a prevenção dos sinais clínicos após uma infecção aguda. A vacinação confere alguma protecção ao feto, não se estendendo, no entanto, essa protecção a 100% dos fetos de vacas expostas, uma vez que uma quantidade suficiente de vírus é capaz de escapar à inactivação pelos anticorpos circulantes e causar infecção transplacentária. Foi demonstrado que a eficácia da vacinação maternal na protecção do feto varia entre 25% e 100% para as vacinas inactivadas e entre 58% e 88% para as vacinas vivas modificadas (Brock 2004). A vacinação dos jovens pode ser útil, prevenindo-se os efeitos imunossupressores do vírus após a infecção ter ocorrido.

2. Trabalho Prático

2.1 Introdução e objectivos

Dado o impacto económico das doenças infecciosas numa exploração produtora de leite, o seu combate é essencial, existindo abordagens curativas e preventivas. As abordagens preventivas têm como objectivo evitar as perdas decorrentes de doença, nomeadamente as

associadas a morte ou refugo precoce dos animais, tratamentos médicos, trabalho extra e diminuição da produção. A prevenção pode envolver o uso de vacinas e/ou a análise e manejo do risco, assentando este último na identificação dos factores de risco presentes e no seu controlo ou na diminuição do seu impacto na exploração, em grande medida através da implementação de medidas de biossegurança. O presente trabalho surge neste contexto, tendo como principais objectivos *a)* obter uma ferramenta de avaliação do risco de introdução, manutenção e disseminação de doença, concretamente IBR e BVD, sob a forma de um questionário, em explorações produtoras de leite; *b)* fazer um levantamento dos factores de risco associados a IBR e BVD presentes nas explorações produtoras de leite que aderiram ao programa de saúde animal Bovicontrol® e que tinham este programa implementado em Outubro de 2009; *c)* avaliar práticas de biossegurança presentes nas referidas explorações.

Para concretizar os objectivos, foi construído um questionário ao produtor, foram feitas visitas a um conjunto de explorações seleccionadas aleatoriamente de entre a população em estudo de modo a preencher o referido questionário e foram analisados e tratados estatisticamente os resultados obtidos.

2.2 Materiais e métodos

A elaboração do Questionário (Anexo 1) partiu da selecção e análise de textos científicos com o objectivo de reunir os factores de risco já identificados para a BVD e para a IBR. Os factores de risco encontrados foram classificados como factores de introdução, de manutenção ou de disseminação de doença. Recorrendo à literatura e à internet, foi feita uma pesquisa, a nível nacional e internacional e uma selecção de planos de biossegurança e *checklists* existentes (Anexo 2). Listaram-se, de forma exaustiva, todas as questões presentes nos planos e *checklists*, de forma a criar uma Lista de Questões. Estas questões foram confrontadas, numa matriz, com os factores de risco listados e foi verificado, de forma sistemática, se as questões listadas permitiam identificar os factores de risco. Com base no cruzamento da Lista de Questões com os factores de risco, foi construída uma primeira versão do inquérito, cobrindo todos os factores de risco das duas doenças, que foi testada e validada em 10 explorações. Nesta fase, foram detectadas algumas inconsistências, que foram corrigidas na versão final do inquérito, que foi realizada em 54 explorações. Em termos gerais, o inquérito visava a proximidade relativamente a outras explorações, o possível contacto com animais de outras explorações, a política de aquisição de animais, o tipo de manejo da reprodução, as medidas de biossegurança relativas a visitantes e viaturas, o controlo de insectos e pragas, as práticas de vacinação, os elementos de higiene, as características das instalações, o manejo dos vitelos, os cuidados com roupa e equipamento e as atitudes perante casos de morte e aborto. Por limitação de espaço, apenas está em anexo o questionário e não

o formulário de inquérito (que tem 7 páginas) que foi utilizado nas explorações, podendo este ser facultado aos elementos do Júri, se estes o pretenderem.

A população em estudo foi o conjunto de explorações de bovinos de leite que aderiram ao programa de saúde animal Bovicontrol® no período de Março a Outubro de 2009, num total de 120 explorações. Sendo desconhecida a prevalência de doença nas explorações, a dimensão da amostra foi calculada para uma prevalência esperada de 50%±10%, de modo a incluir no estudo o número máximo de explorações possível (Thrusfield 2007). Assim, foi determinada uma amostra aleatória perfazendo um total de 54 explorações. Como referido, foram visitadas mais 10 explorações, durante a fase de testagem do inquérito, perfazendo 64 explorações inquiridas. O número de explorações incluídas em cada item da análise estatística nem sempre é 64, ficando as diferenças a dever-se a questões que não foram respondidas, ou a informação que não foi obtida durante a fase de teste do inquérito. Todos os produtores seleccionados para o estudo foram informados previamente, por via telefónica ou pessoalmente, que tinham sido seleccionados e qual o objectivo do estudo, tendo consentido nele.

Nas explorações seleccionadas, foi realizado o inquérito ao produtor, foram observadas as instalações e a implantação da exploração e foi desenhado o respectivo *lay-out* da exploração. Adicionalmente, foram analisados os resultados dos testes laboratoriais realizados no âmbito do programa Bovicontrol®. Os testes laboratoriais envolveram a detecção de anticorpos específicos para cada uma das duas doenças no leite do tanque refrigerado e no soro de todos os animais recorrendo a métodos ELISA (Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus (BHV-1) gB Antibody Test Kit® – Idexx; Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus (BHV-1) gE Antibody Test Kit® – Idexx; LSIVet BVD/BD p80 Blocking One Step® – LSI, Laboratoire Service Internacional), bem como a detecção de DNA do BVDV por PCR no soro (Kit Taqvet BVDV screening® – LSI, Laboratoire Service Internacional). A pesquisa de DNA viral no soro era feita em *pools* de 20 amostras individuais; sempre que um *pool* era positivo no PCR, as amostras individuais que constituíam esse *pool* eram testadas individualmente para a pesquisa de antígeno viral recorrendo a métodos ELISA (Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) Antigen Test Kit® – Idexx). Todos os resultados obtidos nas visitas e no laboratório foram analisados e tratados estatisticamente. A análise estatística consistiu na determinação de medidas epidemiológicas de associação (risco relativo e *odds ratio*) brutas (tabelas A.4.1 a A.4.4, em anexo). Considerou-se um intervalo de confiança de 95% (Thrusfield 2007).

2.3 Resultados

2.3.1 Explorações seleccionadas

Foram seleccionadas 64 explorações, nos distritos de Aveiro (4; 6%), Braga (14; 22%), Coimbra (6; 9%), Leiria (2; 3%), Lisboa (1; 2%), Porto (22; 34%), Setúbal (1; 2%), Viana do Castelo (12; 19%) e Viseu (2; 3%) (figura 1). A proporcionalidade da amostra foi comprovada com o teste do X^2 .

2.3.2 Classificação das explorações

As análises laboratoriais efectuadas no soro e no leite do tanque refrigerado permitiram classificar sanitariamente as explorações relativamente a IBR e a BVD. Assim, das 64 explorações classificadas, foram encontradas 40 suspeitas de IBR (62,5%) e 18 com evidência de circulação actual ou recente de BVDV (28,2%); foram identificados animais PI em 17 explorações (26,6%); 24 explorações foram classificadas como negativas face a IBR (37,5%) e 46 explorações são negativas para BVD (71,9%); 12 explorações foram classificadas como infectadas ou suspeitas relativamente às duas doenças, em simultâneo (18,8%).

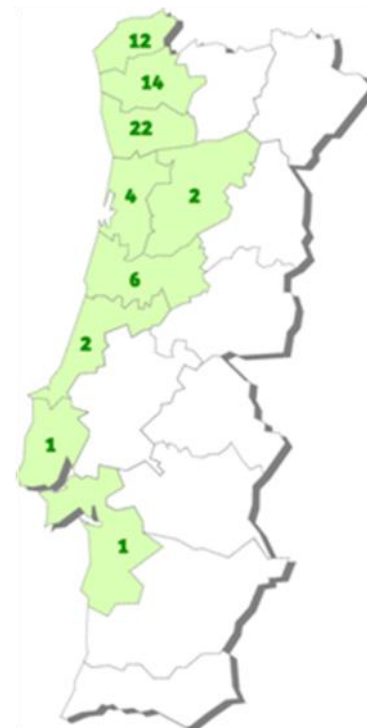


Figura 1 – Distribuição dos inquéritos realizados por distrito.

2.3.3 Proximidade relativamente a outras explorações

Do total de explorações visitadas, apenas em 54 foi possível apurar dados relativamente ao número e proximidade de explorações vizinhas. Cerca de 85% têm uma ou mais vacarias vizinhas num raio de 1000 metros; destas, 43,5% têm apenas uma exploração em redor, 30,4% têm duas explorações em redor, 17,4% têm três, 6,5% têm quatro e 2,2% possuem sete; 63% das vacarias distam dos seus vizinhos 500 metros ou menos. Foram observadas 9,3% de explorações com vacarias confrontantes; destas, 3 eram, simultaneamente, suspeitas de IBR e infectadas com BVD, uma era suspeita de IBR e negativa para BVD e uma era negativa para ambas as doenças. Cada exploração tem, em média, 1,7 vizinhos num raio de 1000 m e 1,1 vizinhos num raio de 500m. Verificou-se ser possível o acesso de animais silvestres em 68,5% das explorações (n=54). O contacto com bovinos de outras explorações, em parques ou pastos, foi observado em 3,2% (n=63). Apenas uma exploração frequenta uma sala de ordenha colectiva. A participação dos animais em exposições, feiras ou concursos verifica-se em 11,1% das explorações (n=63); estas estão, segundo dados obtidos neste trabalho, 2,3 (1,04;5,01) vezes mais em risco de serem positivas ao BVDV do que as explorações que não levam os seus animais a participar em tais eventos;

relativamente a IBR, o risco encontrado não foi significativo. Analisando as explorações que levam os seus animais a exposições, feiras ou concursos, verifica-se que, em 6 os animais são vacinados para IBR e BVD e em uma são vacinados apenas frente a IBR. A testagem dos animais para as referidas doenças, antes ou aquando do regresso do evento, é levada a cabo em três explorações. Em 77,2% das explorações (n=57), verifica-se o contacto dos bovinos com animais domésticos de outras espécies, principalmente cães (77,3%), ovelhas (9,1%), cabras (4,6%) e porcos (2,3%).

2.3.4 Aquisição de animais

Das 63 explorações em que foi possível apurar dados, 81% compraram animais no período de 2001 a 2009. No total, realizaram-se 153 aquisições, das quais resultou a entrada de 437 animais, dos quais 166 no último ano. O número médio de animais por aquisição foi 2,3, com um mínimo de 1 e um máximo de 27 animais por aquisição. Não foi possível apurar o ano de entrada de 12 animais; relativamente aos restantes 425, obteve-se uma média de 47,2 novos animais por ano. A maioria das explorações comprou animais de origem estrangeira (55,6%, n=421), principalmente França (38,7%), Holanda (7,1%) e Alemanha (4,8%), mas também Espanha (2,1%), Polónia (1,9%) e Dinamarca (1%). Dos animais adquiridos em território nacional (44,4%), a maioria é proveniente de outras explorações (40,9%). A compra em leilões, centros de recria ou feiras é pouco frequente com, respectivamente, 1,9%, 1,4% e 0,2%.

Relativamente ao tipo de animais comprados, verifica-se que os produtores compraram, em maior quantidade, vacas (50,7%, n=67), em segundo lugar, novilhas gestantes (41,8%) e, por último, novilhas vazias (14,9%).

No que diz respeito a práticas de biossegurança relacionadas com a introdução de novos animais no efectivo, 41,3% (n=46) dos produtores exigem que os animais comprados sejam livres de IBR e BVD, 42,9% (n=49) testam serologicamente os novos animais para IBR e BVD e apenas 27,7% (n=47) submetem as novas entradas a um período de quarentena. Verificou-se que os produtores que não exigem animais livres de IBR se encontram em maior risco de introduzir a doença no efectivo - RR=2,0 (1,17; 3,51) e OR=7,9 (1,95; 32,03) -, verificando-se o mesmo para os que não verificam os certificados sanitários na compra - RR=1,7 (1,05; 2,69) e OR=5,3 (1,32; 20,92). Outras medidas de biossegurança foram avaliadas, estando listadas na tabela A.3.1, em anexo.

2.3.5 Maneio reprodutivo

Das 63 explorações apuradas, 42 praticam exclusivamente inseminação artificial (66,7%) e 21 recorrem também à cobertura natural (33,3%), uma das quais utilizando um touro proveniente de outra exploração; nas restantes, o touro utilizado é da própria vacaria. Todos os

touros foram testados para IBR e BVD quando as explorações aderiram ao programa Bovicontrol®. Foi encontrado um risco significativo de infecção pelo BVDV nas explorações que utilizam a cobertura natural como complemento à inseminação artificial, relativamente às aquelas que apenas recorrem à inseminação artificial - RR=2,5 (1,16; 5,39) e OR=3,9 (1,22; 12,22). Outro factor de risco analisado foi a compra de embriões, que se assinala em quatro explorações; destas, apenas em duas é conhecida a exploração de origem dos embriões.

2.3.6 Medidas de biossegurança relativas a visitantes e viaturas

Em 84,2% (n=57) das explorações, o veterinário e o técnico de inseminação artificial vestem roupa de trabalho adequada e limpa. O acesso dos visitantes às instalações propriamente ditas é limitado pelo produtor em 57,8% (n=64). A existência de placas informativas foi observada em 9,4% das explorações (n=53), a existência de um registo de entradas de pessoas em 3,1% (n=64) e a existência de um pedilúvio para pessoas activo em 5,7% (n=53) (tabela A.3.2, em anexo).

A existência de um espaço próprio destinado ao estacionamento das viaturas dos visitantes e/ou técnicos foi observada em 62,3% (n=53). É de salientar que, apesar de, em 49,1% das explorações (n=53), o produtor ter o costume de avaliar visualmente o estado de limpeza das viaturas, estas não são lavadas, quer à entrada, quer à saída da exploração. Também não foi observada a presença de rodilúvio activo em nenhuma das explorações visitadas. De 57 explorações, apenas uma possui um local próprio destinado à recolha de animais vivos para venda ou abate; em todas as restantes, estes são carregados num local indiferenciado da exploração ou mesmo fora desta. Quanto aos cadáveres, são carregados em local próprio e destinado para o efeito em 12,5% (n=56) das explorações (tabela A.3.3, em anexo).

2.3.7 Controlo de insectos e pragas

Ao que foi possível apurar neste trabalho, 91,7% das explorações têm um método de controlo de insectos (n=48) e em 8,3% não é feito qualquer controlo. Os métodos utilizados são diversos, variando conforme o local onde se pretende fazer o combate. Nas instalações em geral, o método de controlo é a aplicação de insecticida (39,6%). Esse é também o único método escolhido para controlo directamente nos animais (20,8%). Para os vitleiros, em particular, o método mais observado é o uso de fitas autocolantes (10,4%). Em 14,6% das explorações, o controlo no pavilhão das vacas é feito recorrendo a fitas autocolantes (simultaneamente ou não à aplicação de insecticida) e 16,7% limitam o uso de insecticida ao pavilhão das vacas.

Relativamente ao controlo de pragas, verificou-se a existência de um plano em 80,7% (n=57) das explorações; nestas, a implementação e manutenção do plano de controlo fica, em

84,8%, a cargo do produtor, em 10,9%, a cargo de uma empresa contratada e, em 4,3%, não foi possível apurar a responsabilidade sobre o controlo.

2.3.8 Práticas de vacinação

Neste trabalho, procurou-se conhecer as práticas de vacinação frente a IBR e a BVD, tanto no passado como após a implementação do programa de saúde animal Bovicontrol®.

Relativamente à IBR, verificou-se que, no passado, 75,9% das explorações (n=54) vacinavam os seus animais, tendo esta proporção baixado para 58,2% (n=55) após a implementação do programa Bovicontrol®. Nas explorações que vacinavam, em 80,5% eram usadas vacinas multivalentes convencionais, sendo as vacinas monovalentes para IBR marcadas usadas apenas em 14,6%. Em 4,9% das explorações, o produtor desconhece o tipo de vacina que era utilizada. Actualmente, as vacinas convencionais são administradas em apenas 12,5% das explorações que vacinam frente a IBR e as vacinas marcadas são aplicadas em 87,5%.

Relativamente a BVD, verifica-se também que a proporção de explorações que vacinavam os seus animais diminuiu de 70,4% (n=54), no passado, para 35,2% (n=54), após a entrada no programa Bovicontrol®. Das explorações que recorriam à vacinação no passado, em 81,6% eram aplicadas vacinas multivalentes, em 13,2% vacinas monovalentes para BVD e em 5,3% era desconhecido pelo produtor o tipo de vacina utilizada. Após a adesão ao programa, as vacinas multivalentes são administradas em 15,8% das explorações que vacinam e as monovalentes em 84,2%. Das 17 explorações onde foram identificados animais PI, 88,2% vacinavam os seus animais.

Todas as vacinas utilizadas nas explorações inquiridas eram inactivadas.

No gráfico 1 (Anexo 3), estão representadas as situações das explorações visitadas relativamente à vacinação frente a IBR e BVD.

2.3.9 Práticas de higiene

Para averiguar a higiene existente na exploração, foram observadas visualmente as instalações e o produtor foi inquirido acerca de práticas gerais de higiene (tabela A.3.4, em anexo), da frequência de remoção de camas e/ou dejectos, lavagem e desinfectação dos diversos parques, bem como dos próprios equipamentos de limpeza e do local de armazenamento desses equipamentos. De uma maneira geral, os níveis de higiene são maiores, bem como a frequência de lavagem e desinfectação, nos parques das vacas em lactação e das vacas secas; por outro lado, os parques de recria e de novilhas são os mais descurados a este nível.

Em 68,5% das explorações (n=54), as pás, vassouras, rodos manuais e outros equipamentos de limpeza são comuns aos alojamentos de todos os animais; em 24,1%,

existem equipamentos específicos para cada pavilhão e apenas 7,4% possuem equipamentos diferenciados para cada lote ou grupo etário.

2.3.10 Instalações

Nas 45 explorações onde foi contabilizado o tamanho do efectivo, estavam presentes, à data da visita, um total de 5421 animais. O tamanho médio dos efectivos é de 120 animais por exploração, registando-se um mínimo de 27 animais e um máximo de 476. Foi observado que as explorações com mais de 100 animais apresentam um risco de BVD estatisticamente significativo, relativamente às explorações com menos de 100 animais - RR=5,0 (1,23; 20,25) e OR=8,3 (1,56; 44,64).

Durante a visita às explorações, os diferentes parques foram avaliados quanto à luminosidade, ventilação, densidade animal, espaço de manjedoura e de bebedouro. Foram também observados o conforto e dimensão das camas, o conforto térmico, a presença ou não de uma enfermaria na exploração e o manejo dos animais doentes (tabela A.3.5, em anexo).

A presença de camas subdimensionadas ou desconfortáveis foi observada em 25% das explorações (n=64); 48,4% continham camas adequadas; em 26,6% não existiam camas ou a questão não foi respondida. Utilizando apenas os dados relativos às explorações onde foi observada a presença de camas, foi verificado que as explorações onde estas eram subdimensionadas ou desconfortáveis se apresentam mais em risco de serem positivas a IBR, relativamente às restantes - RR=1,7 (1,09; 2,59) e OR=4,6 (1,10; 19,50).

A separação dos animais em lotes e o seu alojamento em função do grupo etário foi observada em 93,5% das explorações (n=62). As restantes, nas quais os animais não estão separados, apresentam um maior risco de serem positivas a IBR - RR=1,7 (1,35; 2,04) -, relativamente às primeiras; no que respeita à infecção pelo BVDV, não foi encontrado um risco aumentado, tendo sido verificado que todas as explorações com o factor de risco são negativas para BVD.

Relativamente à luminosidade, as instalações foram classificadas numa escala de 1 a 4 (tabela A.3.6, em anexo); a classificação média obtida pelas explorações foi 3 para os parques de recria, novilhas, lactação, vacas secas e enfermarias e 2 para os vitleiros individuais e colectivos; apenas a título de exemplo, refira-se que 55,3% (n=38) dos vitleiros individuais e 50% (n=46) dos vitleiros colectivos apresentavam uma luminosidade fraca ou muito fraca, valor que baixa para os 22,6% no caso dos parques de vacas em lactação (n=53).

No que diz respeito à ventilação, foi seguido o mesmo esquema de classificação em quatro categorias (tabela A.3.7, em anexo); a classificação média obtida pelas explorações foi 3 para os parques de novilhas, lactação e vacas secas e 2 para os vitleiros individuais, vitleiros colectivos, parques de recria e enfermarias; os vitleiros revelavam os piores níveis de ventilação, com 68,4% (n=38) dos individuais e 65,2% (n=46) dos colectivos a apresentarem

ventilação fraca ou muito fraca; as instalações com melhor desempenho a este nível eram os parques de vacas em lactação e de vacas secas, 67,9% (n=53) e 70,7% (n=41) dos quais, respectivamente, apresentavam níveis de ventilação aceitável ou boa.

Os dados obtidos relativos à densidade de animais, espaço de manjedoura e espaço de bebedouro estão compilados na tabela A.3.8, em anexo.

2.3.11 Maneio dos vitelos

Em 90% das explorações (n=57), o colostro é administrado aos vitelos nas primeiras horas de vida, numa quantidade de 2 litros, em média; nas restantes, o tempo decorrido desde o nascimento até à administração do colostro é variável, ocorrendo, normalmente, na ordenha seguinte. Em 3,2% das explorações (n=63) é fornecido aos vitelos simultaneamente colostro de diferentes vacas. Em 23,8% das explorações (n=63), os vitelos são agrupados sem estarem devidamente identificados. Relativamente à higiene dos baldes pelos quais os vitelos bebem o leite, em 86,8% das explorações, esses baldes são lavados após cada toma (n=53) e em 22,6% os baldes são desinfectados após cada toma.

2.3.12 Cuidados relativos a roupa e equipamento

A adequação da roupa e do calçado das pessoas que têm acesso às instalações dos animais propriamente ditas, bem como a sua higiene, foi já, em parte, tratada no item relativo às medidas de biossegurança relacionadas com os visitantes. No entanto, torna-se também importante avaliar as atitudes do próprio produtor nesse campo, como pessoa que contacta diariamente com os seus animais e, eventualmente, com animais fora da sua exploração, nomeadamente em feiras, concursos ou mesmo em outras explorações. Assim, constatou-se que 92,5% dos produtores (n=53) vestem roupa adequada para trabalhar e 94,3% calçam botas de borracha; apesar disso, de 42 produtores que afirmam deslocar-se com alguma frequência a locais onde contactam com outros bovinos, 57,1% fazem-no com a roupa de trabalho e 61,9% com o calçado de trabalho.

Apenas em 42,3% das explorações (n=52) existiam equipamentos básicos para uso pelo veterinário, nomeadamente tubos orogástricos, arganéis e cordas; nas restantes, o veterinário utiliza os equipamentos que traz consigo; nestas explorações, o veterinário tem cuidados de desinfectação desses equipamentos em 60%, o mesmo não acontecendo em 30% das explorações; em 10%, o produtor não presta atenção aos cuidados de desinfectação dos equipamentos por parte do veterinário. Os restantes resultados encontram-se na tabela A.3.9, em anexo.

2.3.13 Procedimentos perante casos de morte e aborto

Quando questionados acerca do comportamento em caso de aborto, apenas 26,3% dos produtores (n=57) afirmaram já ter efectuado análises laboratoriais ao sangue de vacas que abortaram e uma percentagem ainda menor (15,8%) fá-lo de uma forma sistemática; tecidos de fetos abortados são enviados sistematicamente para laboratório em 3,7% das explorações (n=54); 18,5% dos produtores afirmaram já ter enviado amostras fetais para diagnóstico de causa de aborto (n=54).

Relativamente às mortes por causa desconhecida, em 37,5% das explorações (n=56), uma necrópsia é levada a cabo esporadicamente e apenas em 7,1% todos os animais são necropsiados.

2.3.14 Associações de risco

A seguinte tabela resume os factores de risco considerados significativos neste trabalho, bem como as respectivas medidas de associação de risco (risco relativo e *odds ratio*).

Tabela 3 – Resumo dos factores de risco de IBR e BVD significativos num intervalo de confiança a 95%.

Factores de Risco		RR	IC a 95% de RR	OR	IC a 95% de OR
IBR	Não exige animais livres de IBR na compra	2,0	1,17;3,51	7,9	1,95;32,03
	Não verifica certificados sanitários na compra	1,7	1,05;2,69	5,3	1,32;20,92
	Animais não alojados em função do grupo etário	1,7	1,35;2,04	-	-
	Camas subdimensionadas ou desconfortáveis	1,7	1,09;2,59	4,6	1,10;19,50
BVD	Participação em feiras, exposições ou concursos	2,3	1,04;5,01	-	-
	Recurso a cobrição natural	2,5	1,16;5,39	3,9	1,22;12,22
	Tamanho do efectivo (mais de 100 animais)	5,0	1,23;20,25	8,3	1,56;44,64

Legenda: RR – risco relativo; OR – *odds ratio*; IC – intervalo de confiança.

2.4. Discussão

Num trabalho realizado nos concelhos de Póvoa de Varzim e de Ponte de Lima, obtiveram-se 11,9% de explorações leiteiras infectadas com animais PI (Ribeiro & Pereira 2004); no presente trabalho, a prevalência encontrada é superior. Esta elevada prevalência pode ser justificada, uma vez que a amostra estudada não representa a população de explorações leiteiras em Portugal, mas sim uma subpopulação, constituída por explorações nas quais os produtores se sentiram compelidos a aderir a um programa de saúde animal. A nível europeu, a prevalência de animais com anticorpos varia entre 40 e 70% e a prevalência de animais PI entre 1 a 2% (Houe 2003). A prevalência de IBR, a nível europeu, apresenta grandes diferenças; a título de exemplo, antes de se iniciarem as respectivas campanhas de erradicação, a prevalência, na Áustria, era de 0,58% e, em Itália, era de 62 a 85% (Ackermann

& Engels 2006). A elevada prevalência de explorações, no presente estudo, suspeitas de IBR prende-se com o uso generalizado de vacinas convencionais frente ao BoHV-1, que impedem a distinção entre animais naturalmente infectados e animais vacinados. Deste modo, a interpretação dos resultados deve ser cautelosa, uma vez que, caso fosse possível esta distinção, as associações encontradas entre os factores de risco e a IBR iriam ser diferentes e outros riscos estatisticamente significativos poderiam ser encontrados.

Foi observada uma percentagem elevada de explorações com uma ou mais vacarias vizinhas num raio de 1000 metros, o que poderia constituir um factor de risco de transmissão de doença entre estas explorações. Contudo, não foi encontrado, para estas explorações, um risco acrescido, relativamente à infecção, quer pelo BVDV, quer pelo BoHV-1, o que, todavia, vai de encontro aos resultados de um outro estudo (Ribeiro & Pereira 2004), dando conta que, das 73% de explorações com pelo menos um vizinho num raio de 500 metros, nenhuma delas evidenciara um animal transitória ou persistentemente infectado com BVDV. Apenas em 3,2% da amostra é possível o contacto com bovinos de outras explorações e em nenhuma os animais frequentam pastos comunitários, facto que pode limitar a transmissão de doenças nestas explorações.

A compra de animais é uma importante forma de entrada, quer de IBR, quer de BVD, nas explorações; a compra de animais PI ou de animais gestantes cujo feto é PI é a principal forma de introdução do BVDV numa exploração (Brownlie 2002). No conjunto de explorações analisadas, a grande maioria adquiriu animais nos últimos nove anos; foram contabilizadas 437 novas entradas, quantidade que pode estar subestimada, uma vez que esta informação foi obtida na entrevista ao produtor e não a partir da verificação do livro de existências da exploração. Mais de metade dos animais comprados eram provenientes de importação, mas não se verificou um risco aumentado de infecção por BVD ou por IBR nas explorações que importaram animais, relativamente àquelas que os adquiriram no mercado nacional. Também num estudo anterior (Ribeiro & Pereira 2004), o risco de introdução de um PI a partir de animais importados foi no mínimo 1,1%, não sendo superior ao de introduzir o vírus a partir de animais do mercado nacional; o mesmo estudo concluía que a introdução de animais PI provenientes da UE era responsável por 30% da prevalência de animais PI na população de explorações. Relativamente ao tipo de animais comprados, verifica-se que os produtores compraram, em maior quantidade, vacas, em segundo lugar, novilhas gestantes e, por último, novilhas vazias. Estes dados confirmam a tendência verificada num estudo realizado na região do Entre Douro e Minho, onde se concluía existir, a partir do ano 2000, uma preferência crescente pela compra de vacas, em detrimento da aquisição de novilhas (Pereira 2004).

A utilização da cobrição natural pode transmitir o BVDV e a forma genital da infecção pelo BoHV-1; mesmo a inseminação artificial pode ser um factor de transmissão de ambas as doenças (Trembley 1996, Muylkens *et al.* 2007). Foi encontrado um risco significativo de

infecção pelo BVDV, mas não pelo BoHV-1, nas explorações que utilizam a cobertura natural como complemento à inseminação artificial, relativamente às aquelas que apenas recorrem à inseminação artificial - RR=2,5 (1,16; 5,39) e OR=3,9 (1,22; 12,22).

A entrada de viaturas numa exploração é praticamente impossível de evitar. É desejável, no entanto, criar locais próprios para estacionamento, que permitam uma lavagem e desinfecção dos veículos quando justificado. Também a recolha de animais com destino ao matadouro e de cadáveres deve ser feita num local afastado das instalações dos animais e deve ser evitado o cruzamento entre os percursos efectuados pelos veículos de transporte de animais e pelos tractores e outros veículos de transporte de alimentos (Noordhuizen & Jorritsma 2009). A existência de rodilúvio é também importante, especialmente para viaturas que costumam deslocar-se entre explorações. Foi verificado que o cuidado com viaturas é, ainda, raro entre as explorações visitadas. Relativamente às medidas de biossegurança aplicáveis às pessoas que visitam a exploração, destacam-se, pela positiva, o cumprimento, na maioria dos casos, por parte do veterinário e do técnico de inseminação artificial, das regras relativas à adequação e higiene da roupa e calçado de trabalho e o hábito, por parte de mais de metade dos produtores, de limitar o acesso dos visitantes às instalações dos animais propriamente ditas. Porém, seria desejável a criação de registos de entradas de pessoas em mais explorações, a colocação de placas informativas e a construção de pedilúvios.

Os efeitos negativos da IBR e da BVD nas explorações exigem a implementação de medidas de controlo que, no nosso país, coincidem quase sempre com planos de vacinação (Pereira 2004). Em Portugal, estão presentes quer vacinas frente a IBR, quer frente a BVD, existindo também vacinas com valências para ambos os vírus e combinadas com outras valências (Vírus Respiratório Sincicial Bovino, Vírus *Parainfluenza* 3, entre outros); estão disponíveis vacinas atenuadas e vacinas inactivadas. Neste trabalho, procurou-se conhecer as práticas de vacinação frente a IBR e a BVD, tanto no passado como após a implementação do programa de saúde animal Bovicontrol®. Constatou-se que algumas explorações que vacinavam os seus animais frente a IBR e BVD, na maioria dos casos recorrendo a vacinas multivalentes, deixaram de o fazer após a análise dos resultados laboratoriais obtidos no âmbito do programa Bovicontrol®, o que demonstra que existia um gasto acrescido com a vacinação em explorações onde os vírus não circulavam mas onde, todavia, poderia existir um elevado risco de infecção; em 88,2% das explorações onde foram identificados animais PI, os animais eram vacinados frente ao BVDV; esta elevada percentagem traduz, provavelmente, um esforço do produtor em controlar os efeitos marcados provocados pela presença do BVDV na exploração, nomeadamente a nível reprodutivo. As vacinas atenuadas podem representar um risco de introdução de BVDV nas explorações, se tiver ocorrido uma contaminação pelo vírus não citopatogénico durante o processo de fabrico (Roeder & Harkness, 1986) ou se houver recombinação entre as estirpes vacinal e selvagem (Lindberg & Alenius 1999). Todas as

vacinas utilizadas nas explorações inquiridas eram inactivadas, não colocando esse risco de infecção.

A separação dos animais em lotes e o seu alojamento em função do grupo etário é uma importante forma de limitar a disseminação de doenças no efectivo. Efectivamente, foi encontrado um risco estatisticamente significativo de infecção pelo BoHV-1 nas explorações onde os animais são mantidos num mesmo grupo, independentemente da idade, relativamente às explorações onde são mantidos em lotes - RR=1,7 (1,35; 2,04). A reactivação de uma infecção latente pelo BoHV-1 é, muitas vezes, responsável pela manutenção da infecção no efectivo (Muylkens *et al* 2007). A infecção de novos animais por portadores latentes pode ocorrer em variadas ocasiões, sendo a reactivação despoletada por situações de stress. Neste trabalho, foi possível constatar que a existência de camas subdimensionadas ou desconfortáveis, actuando como potencial factor de stress, está associada a um risco acrescido de positividade face a IBR - RR=1,7 (1,09; 2,59) e OR=4,6 (1,10; 19,50). Também a dimensão do efectivo foi confirmada como factor de risco de BVD, comparando efectivos inferiores a 100 animais com efectivos constituídos por mais de 100 animais - RR=5,0 (1,23; 20,25) e OR=8,3 (1,56; 44,64).

3. Conclusão

Os objectivos do trabalho foram integralmente atingidos. O inquérito elaborado aborda todos os factores de risco relevantes da IBR e da BVD, podendo ser usado em qualquer exploração de aptidão leiteira para avaliar o risco existente relativamente a cada uma das doenças e, dessa forma, traçar prioridades na implementação de um plano de biossegurança.

Foi feito um levantamento dos factores de risco existentes nas explorações aderentes ao programa de saúde animal Bovicontrol® e foram identificados os mais prevalentes e os associados a um risco estatisticamente significativo de IBR e/ou BVD.

Dos factores de risco documentados na literatura, os mais frequentemente encontrados foram a excessiva proximidade relativamente a explorações vizinhas; a introdução de novos animais sem conhecimento do seu estado vacinal ou sanitário e sem sujeição a quarentena; a escassez de espaços próprios destinados à recolha de animais vivos e de cadáveres; a quase inexistência de pedilúvios para pessoas e de registos de entradas na exploração; a inexistência de rodilúvios. Como pontos fortes, nestas explorações, destacam-se a não utilização de pastos comunitários; a fraca possibilidade de contacto directo entre animais de diferentes explorações, através de cercas; a implementação de planos de controlo de insectos; o alojamento dos animais em função do grupo etário; o hábito de administrar o colostro aos vitelos poucas horas

após o nascimento; a vontade dos produtores em melhorar o estatuto sanitário das suas explorações e a motivação para implementar as necessárias medidas de biossegurança.

4. Bibliografia

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

Baker J (1987) "Bovine Viral Diarrhea Virus: a review" **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 190, 1449-1458

Blood D & Radostis O (1989) "Infectious Bovine Rhinotracheitis (red nose)" *in* **Veterinary Medicine**, 7ª Ed, Baillière Tindall, 899-906

Bolin S, Grooms D (2004) "Origination and consequences of bovine viral diarrhea virus diversity" **Veterinary Clinics Food Animal Practice** 20, 51-68

Bosch J, Kaashoek M, Oirschot J (1997) "Inactivated bovine herpesvirus 1 marker vaccines are more efficacious in reducing virus excretion after reactivation than a live marker vaccine" **Vaccine** 15, 1512-1517

Bowland S, Shewen P (2000) "Bovine respiratory disease: Commercial vaccines currently available in Canada" **Canadian Veterinary Journal** 41, 33-48

Brand A, Noordhuizen J, Schukken Y (1996) "Bovine Virus Diarrhea Virus (BVDV)" *in* **Herd Health and Production Management in Dairy Cattle**, Wageningen Pers, the Netherlands, 473-485

Brock K (2004) "Strategies for the control and prevention of bovine viral diarrhea virus" **Veterinary Clinics Food Animal Practice** 20, 171-180

Brownlie J (2002) "Bovine virus diarrhoea virus: pathogenesis and control" *in* **XXII World Buiatrics Congress, 18-23 August 2002, Hannover, Germany**, 24-30

Brugère-Picoux (1989) "Le complexe diarrhee virale bovine – maladie des muqueuses" **Bull. Soc. Vét. Prat. de France** 73, 435-459

CE (2004) "Decisão da Comissão 2004/558/CE de 15 de Julho de 2004, que dá execução à Directiva 64/432/CEE no que se refere a garantias suplementares para o comércio intracomunitário de bovinos relativamente à rinotraqueíte infecciosa dos bovinos e à aprovação dos programas de erradicação apresentados por determinados Estados-Membros" **JO L** 249 de 23.7.2004, p. 20

CE (2008) "Decisão da Comissão 2008/233/CE de 17 de Março de 2008, que altera a Decisão 2004/558/CE que dá execução à Directiva 64/432/CEE no que se refere a garantias suplementares para o comércio intracomunitário de bovinos relativamente à rinotraqueíte

infecciosa dos bovinos e à aprovação dos programas de erradicação apresentados por determinados Estados-Membros” **JO L** 76 de 19.3.2008, 56-57

Cortese V, West K, Ellis J (1996) “Clinical and immunological responses to type 2 BVDV challenge in vaccinated and unvaccinated calves” in **XIX World Buiatrics Congress**, BCVA, Edinburgh, 2, 610-613

Dannacher G, Perrin M, Moussa A, Fedida M (1985) “La Rhinotrachéite Bovine Infectieuse” **Recueil de Medecine Vétérinaire** 161, 1069-1074

Dargatz A, Garry F, Traub-Dargatz J (2002) “An introduction to biosecurity of cattle operations” **Veterinary Clinics Food Animal Practice** 18, 1-5

Dubovi E (1994) “Impact of bovine viral diarrhea virus on reproductive performance in cattle” **Veterinary Clinics Food Animal Practice** 10, 503-513

Dubovi E (1996) “Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhea virus infections” **Veterinary Medicine** 9, 867-872

EFSA (2006) “Definition of a BoHV-1-free animal and a BoHV-1-free holding, and the procedures to verify and maintain this status” **EFSA Journal** 311, 1-65

Engels M, Ackermann M (1996) “Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections” **Veterinary Microbiology** 53, 3-15

Fenner F, Paul E, Gibbs J, Murphy F, Rott R, Studdert M, White O (1993) “Flaviviridae” in **Veterinary Virology**, 2^a Ed, 443-453

Fourichon C, Beaudeau F, Bareille N, Seegers H (2005) “Quantification of economic losses consecutive to infection of a dairy herd with bovine viral diarrhea virus” **Preventive Veterinary Medicine** 72, 177-181

Fredriksen B, Ødegaard S, Løken T (1998) “The effect of Bovine Virus Diarrhoea Virus on Reproduction in Recently Infected Norwegian Dairy Herds” **Acta vet. scand.** 39, 99-108

Fredriksen B, Sandvik T, Løken T, Ødegaard S (1999) “Level and duration of serum antibodies in cattle infected experimentally and naturally with bovine virus diarrhea virus” **Veterinary Record** 144, 111-114

Gibbs E, Rweyemamu M (1977) “Bovine herpesviruses. Part I. Bovine herpesvirus 1.” **The Veterinary Bulletin** 47, 317-331

Grooms D (2004) “Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhea virus” **Veterinary Clinics Food Animal Practice** 20, 5-19

Gunn G, Heffernan C, Hall M, McLeod A, Hovi M (2008) “Measuring and comparing constraints to improved biosecurity amongst GB farmers, veterinarians and the auxiliary industries” **Preventive Veterinary Medicine** 84, 310-323

Gunn H (1993) “Role of fomites and flies in the transmission of bovine viral diarrhea virus” **The Veterinary Record** 132, 584-585

- Houe H (1999) "Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhea virus (BVDV) infections" **Veterinary Microbiology** 64, 89-107
- Houe H (2003) "Economic impact of BVDV infection in dairies" **Biologicals** 31, 137-143
http://www.oie.int/wahis/public.php?page=disease_status_lists
- Kaashoek M, Straver P, Van Rooij E, Quak J, Van Oirschot J (1996) "Virulence, immunogenicity and reactivation of seven bovine herpesvirus 1.1 strains: clinical and virological aspects" **The Veterinary Record** 139, 416-421
- Kelling C (2004) "Evolution of bovine viral diarrhea virus vaccines" **Veterinary Clinics Food Animal Practice** 20, 115-129
- Lemaire M, Pastoret P, Thiry E (1994) "Le contrôle de l'infection par le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine" **Ann. Méd. Vét.** 138, 167-180
- Liess B (1990) "Bovine Viral Diarrhea Virus" in **Virus Infections of Vertebrates**, Horzinek M.C. (Series Ed.), Vol. 3, Elsevier Science Publishers BV, 247-263
- Lindberg A, Alenius S (1999) "Principles for eradication of bovine viral diarrhea virus (BVDV) infections in cattle populations" **Veterinary Microbiology** 64, 197-222
- Lindberg A, Houe H (2005) "Characteristics in the epidemiology of bovine viral diarrhea virus (BVDV) of relevance to control" **Preventive Veterinary Medicine** 72, 55-73
- Mars M, Bruschke C, Oirschot J (1999) "Airborne transmission of BHV1, BRSV, and BVDV among cattle is possible under experimental conditions" **Veterinary Microbiology** 66, 197-207
- Morley P (2002) "Biosecurity of veterinary practices" **Veterinary Clinics Food Animal Practice** 18, 133-155
- Muykens B, Thiry J, Kirten P, Schynts F, Thiry E (2007) "Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis" **Veterinary Research** 38, 181-209
- Niza-Ribeiro J, Pereira A, Souza J, Madeira H, Barbosa A, Afonso C (2005) "Estimated BVDV-prevalence, -contact and -vaccine use in dairy herds in Northern Portugal" **Preventive Veterinary Medicine** 72, 81-85
- Noordhuizen J & Jorritsma R (consultado em 2009) "The Role of Animal Hygiene and Animal Health in Dairy Operations" in <http://www.isah-soc.org/documents/2005/keynotespeakers/.../nordhuisen%20.doc>
- OIE, Office International des Epizooties (2008) "Infectious Bovine Rhinotracheitis / Infectious Pustular Vulvovaginitis" **OIE Terrestrial Manual 2008**, 752-766
- Pereira A (2003) "Estudo sobre Algumas Viroses Respiratórias na Região do Entre-douro e Minho – Parte I" **Revista Seleção ABLN** 16, 8-10
- Pereira A (2004) "Estudo sobre Algumas Viroses Respiratórias na Região do Entre-douro e Minho – Parte II" **Revista Seleção ABLN** 17, 8-10

Pereira A (2004) “Estudo sobre Algumas Viroses Respiratórias na Região do Entre douro e Minho – Parte III – A Diarreia Viral Bovina (BVD)” **Revista Selecção ABLN** 18, 8-12

Pereira A (2004) “Estudo sobre Algumas Viroses Respiratórias na Região do Entre douro e Minho – Parte IV – A Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR)” **Revista Selecção ABLN** 19-20, 8-10

Ribeiro J, Pereira A (2004) “Aspectos da epidemiologia da infecção e persistência do vírus da diarreia viral bovina em explorações de bovinos leiteiros” **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias** 99, 41-51

Ridpath J (2005) “Practical significance of heterogeneity among BVDV strains: Impact of biotype and genotype on U.S. control programs” **Preventive Veterinary Medicine** 72, 17-30

Roeder P, Harkness J (1986) “BVD virus infection: Prospects for control” **Veterinary Record** 118, 143-147

Saliki J, Dubovi E (2004) “Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhea virus infections” **Veterinary Clinics Food Animal Practice** 20, 69-83

Sandvik T (1999) “Laboratory diagnostic investigations for bovine viral diarrhea virus infections in cattle” **Veterinary Microbiology** 64, 123-134

Sandvik T (2004) “Progress of control and prevention programs for bovine viral diarrhea virus in Europe” **Veterinary Clinics Food Animal Practice** 20, 151-169

Smith D, Grotelueschen D (2004) “Biosecurity and biocontainment of bovine viral diarrhea virus” **Veterinary Clinics Food Animal Practice** 20, 131-149

Straub O (1990) “Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus” in **Virus Infections of Vertebrates**, Horzinek M.C. (Series Ed.), Vol. 3, Elsevier Science Publishers BV, 71-108

Strube W, Auer S, Block W, Heinen E, Kretzdorn D, Rodenbach C, Schmeer N (1996) “A gE deleted infectious bovine rhinotracheitis marker vaccine for use in improved bovine herpesvirus 1 control programs” **Veterinary Microbiology** 53, 181-189

Thiry J, Muylkens B, Thiry E (2008) “Infectious bovine rhinotracheitis and the epidemiological role of the other ruminant species” in **XXV Jubilee World Buiatrics Congress 2008, 6-11 July, Budapest, Hungary**, 116-121

Thrusfield M (2007) “Surveys”, **Veterinary Epidemiology**, 3^a Ed, Blackwell Science, 232-234

Tremblay R (1996) “Transmission of bovine viral diarrhea virus” **Veterinary Medicine** 9, 858-866

Van Oirschot J, Kaashoek M, Rijsewijk F (1996) “Advances in the development and evaluation of bovine herpesvirus 1 vaccines” **Veterinary Microbiology** 53, 43-54

Vilcek S, Paton D, Durkovic B, Strojny L, Ibata G, Moussa A, Loitsch A, Rossmanith W, Vega S, Scicluna M, Palfi V (2001) “Bovine viral diarrhea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups” **Archives of Virology** 146, 99-115

Anexo 1 – Questionário

- Implantação da exploração (número de explorações vizinhas e respectivas distâncias, possibilidade de acesso de animais silvestres e de contacto com bovinos de outras explorações em parques ou pastos);
- Utilização de pastos comunitários, possibilidade de contacto com animais de outras espécies, participação dos animais em feiras, exposições ou concursos (em caso afirmativo, medidas implementadas);
- Utilização da sala de ordenha por animais de outras explorações ou de sala de ordenha colectiva (em caso afirmativo, medidas implementadas);
- Políticas de aquisição de animais (datas de entrada na exploração, número de animais, origem e tipo de animal, quarentena - em caso afirmativo, duração, tipo de local e manejo dos animais em quarentena -, estatuto sanitário e vacinal dos novos animais, verificação de boletins sanitários e controlo serológico dos novos animais);
- Prática de cobrição natural (origem e estatuto sanitário do touro);
- Compra de embriões e origem dos mesmos;
- Existência de rodilúvio activo, registos de entradas de veículos, hábito de avaliar visualmente as viaturas que entram na exploração, existência de espaços próprios destinados à recolha de animais vivos, à recolha de cadáveres, ao estacionamento de viaturas de visitantes e à lavagem de veículos;
- Existência de pedilúvio para pessoas activo, equipamento para fornecer a visitantes ou técnicos, utilização, por parte dos visitantes, de roupa e calçado adequados e limpos, existência de registos de entradas de pessoas, acesso dos visitantes às instalações dos animais propriamente ditas, existência de placas informativas e de local próprio para receber visitantes e técnicos;
- Planos de controlo de insectos e de pragas e responsabilidade sobre estes;
- Práticas actuais e passadas de vacinação (nome comercial da vacina, executor, responsável pela escolha, animais vacinados, motivo da vacinação);
- Separação dos animais por lotes, de acordo com a idade;
- Existência de equipamentos específicos para tarefas de alimentação, diferenciados dos equipamentos de manejo de fezes; equipamentos específicos para cada lote de animais;
- Práticas de higiene levadas a cabo durante operações de alimentação dos animais, frequência de lavagem e desinfecção de equipamentos e de instalações; frequência de remoção de camas e de dejectos;
- Descrição das instalações (número de animais presentes em cada lote, ventilação, iluminação, temperatura, acesso a manjedoura e bebedouro, conforto e dimensão dos cubículos);
- Maneio de animais doentes (existência e tipo de enfermaria, manejo de animais doentes em ordenha);
- Maneio de vitelos (práticas gerais de higiene, administração do colostro, identificação);
- Plano de desparasitação;
- Reutilização de agulhas e de luvas de palpação rectal;
- Práticas de empréstimo de equipamentos, existência de equipamentos básicos para uso pelo veterinário, cuidados de desinfecção dos equipamentos tidos pelo veterinário;
- Adequação da roupa e do calçado do produtor; prática de sair da exploração com a roupa de trabalho;
- Procedimentos em caso de morte ou aborto (necrópsia, envio de sangue ou tecidos para diagnóstico laboratorial de aborto);
- *Layout* da exploração, assinalando os edifícios para os animais, distribuição dos lotes, sala de ordenha, armazéns de máquinas agrícolas e de equipamentos de manejo de alimentos e de manejo de fezes, silos e outros locais de armazenamento de alimentos, locais de armazenamento de chorumes, parque de estacionamento, local de recepção de visitantes, locais de recolha de animais vivos e de recolha de cadáveres, cursos de água, barreiras naturais, cercas e estradas.

Anexo 2 – Lista de Planos de Biossegurança

1. “Guarding Against the Trojan Horse: Practical Biosecurity Measures for Dairy Farms” - **School of Veterinary Medicine, University of California, Davis** (<http://www.vetmed.ucdavis.edu/vetext/INF.../trojanhorse-biosecurity.pdf>, em Outubro de 2009);
2. “Biosecurity Basics for Cattle Operations and Good Management Practices (GMP) for Controlling Infectious Diseases” - **University of Nebraska-Lincoln Extension, Institute of Agriculture and Natural Resources** (<http://www.ianrpubs.unl.edu/pages/publicationD.jsp?publicationId=433>, em 6.10.2009);
3. “The Role of Animal Hygiene and Animal Health in Dairy Operations” - **Noordhuizen J & Jorritsma R** (<http://www.isah-soc.org/documents/2005/keynotespeakers/.../nordhuisen%20.doc>, em Outubro de 2009);
4. “Biosecurity for Dairy Herds Checklist” - **Canadian Food Inspection Agency** (<http://www.inspection.gc.ca/english/anima/biosec/daililiste.shtml>, em 6.10.2009);
5. “Pennsylvania Dairy Health and Biosecurity Manual” - **Pennsylvania State University** (<http://www.inform.umd.edu:8080/EdRes/Topic/AgrEnv/ndd/>, em 6.10.2009);
6. “Color a Biosecurity Program” - **College of Agricultural Sciences - Pennsylvania State University** (<http://www.das.psu.edu/research-extension/dairy/capitalregion/news/df-200702-03>, em 06.10.2009);
7. “Biosecurity Plan Australian Dairy Industry” - **Australian Dairy Industry** (http://www.farmbiosecurity.com.au/shadomx/apps/fms/fmsdownload.cfm?file_uuid=69558E38-B68F-FE2B-7971-F309955362E8&siteName=aahc, em Outubro de 2009);
8. “Reducing risk: biosecurity on dairy farms” - **Teagasc Dairy Production Research Centre, Moorepark, Ireland** (Irish Veterinary Journal, Volume 62, Number 9, 611-616);
9. “Biosecurity and Hygiene on the Dairy Farm” - **FarmCare GB Ltd** (http://farmcaregb.com/downloads/08/Biosecurity_Dairy_Farm.pdf, em Outubro de 2009);
10. “Farm Biosecurity Risk Assessment” - **The University of Vermont** (http://www.uvm.edu/~ascibios/Assesment/Farm_Biosecurity_Risk_Assesment.html, em 2.9.2009);
11. “Biosecurity for Dairy Facilities” - **Bureau of Animal Health, Massachusetts Department of Agricultural Resources** (http://www.mass.gov/agr/animalhealth/dairy_facility_biosecurity.htm, em Outubro de 2009);
12. “Applied Biosecurity for Dairy Farms” - **Proceedings of the World Buiatrics Congress, Québec, Canada, 2004** (www.ivos.org/proceedings/wbc/.../WBC2004-Cullor-simple.pdf, em Outubro de 2009);
13. “Risk Management of BVD and IBR” - **Disease Surveillance and Investigation Branch, Veterinary Sciences Division, Department of Agriculture and Rural Development, Northern Ireland** (<http://www.afbini.gov.uk/adds-cattlebvd.pdf>, em Outubro de 2009);
14. “Herd Secure™ Biosecurity Strategies” - **Pfizer Animal Health®** (http://www.moomilk.com/archive/a_health_45.htm, em 1.10.2009);
15. “Practical and Sensible Dairy Farm Biosecurity” - **Proceedings of the 6th Western Dairy Management Conference, March 12-14, 2003, Reno, 201-206** (<http://www.wdmc.org/2003/Practical%20and%20Sensible%20Dairy%20Farm%20Biosecurity.pdf>, em 6.10.2009);
16. “On Farm Biosecurity: Traffic Control and Sanitation” - **The Ohio State University** (<http://ohioline.osu.edu/vme-fact/0006.html>, em Outubro de 2009);
17. “New York State Cattle Health Assurance Program” - **NYS Department of Agriculture and Markets** (<http://nyschap.vet.cornell.edu/factsheet/self-assessment.pdf>, em Outubro de 2009);
18. “Biosecurity on Dairies” - **Bovine Alliance on Management and Nutrition** (http://www.aphis.usda.gov/vs/ceah/ncahs/nahms/dairy/bamn/BAMN01_BiosecurityDairies.pdf, em 6.10.2009);
19. “Biosecurity at ADVS/UAES Farms” - **Animal, Dairy and Veterinary Science Department, Utah Ag Experiment Station** (<http://extension.usu.edu/ah/biofarms.htm>, em 12.11.2003);
20. “Biosecurity in Practice Series” - **farmandranchbiosecurity.com** (http://www.agri.state.id.us/Categories/Animals/Documents/biosec_ip_visitors.pdf, em Outubro de 2009);
21. “Biosecurity Code for Northern Ireland Farms” - **Department of Agriculture and Rural Development** (<http://www.loughs-agency.org/archive/publications/biosecurity-code-booklet.pdf>, em Outubro de 2009).

Anexo 3 – Tabelas e Gráficos

Tabela A.3.1 - Resultados obtidos da avaliação das medidas de biossegurança tomadas na compra de animais.

Medidas de biossegurança na compra de animais	Sim		Não		Total
	%	N	%	N	
Exige animais livres de IBR e BVD na compra	41,3	19	58,7	27	46
Conhece o estatuto vacinal dos animais comprados	37,3	19	62,7	32	51
Verifica os certificados sanitários na compra	44,4	20	55,6	25	45
Quarentena dos novos animais	27,7	13	72,3	34	47
Controlos serológicos aos novos animais	42,9	21	57,1	28	49

Legenda: N – número de explorações

Tabela A.3.2 – Resultados obtidos da avaliação das medidas de biossegurança relativas aos visitantes da exploração.

Medidas de biossegurança relativas a visitantes	Sim		Não		Total
	%	N	%	N	
Existência de placas informativas	9,4	5	90,6	48	53
Limita o acesso de pessoas às instalações propriamente ditas	57,8	37	42,2	27	64
Manutenção de um registo de entradas de pessoas	3,1	2	96,9	62	64
Existência de pedilúvio activo	5,7	3	94,3	50	53
Local próprio para receber visitantes/técnicos	43,4	23	56,6	30	53
Equipamento próprio para fornecer a visitantes	20,6	13	79,4	50	63
Veterinário e técnico de IA usam roupa/calçado adequado/limpo	84,2	48	15,8	9	57
Outros técnicos usam roupa/calçado adequado/limpo	69,6	39	30,4	17	56

Legenda: N – número de explorações

Tabela A.3.3 – Resultados obtidos da avaliação da biossegurança relativa às viaturas que entram na exploração.

Medidas de biossegurança relativas a viaturas	Sim		Não		Total
	%	N	%	N	
Manutenção de um registo de entradas de viaturas	1,6	1	98,4	62	63
Avaliação visual do estado de limpeza das viaturas	49,1	26	50,9	27	53
Lavagem das viaturas à entrada/saída da exploração	0	0	100	53	53
Existência de rodilúvio activo	0	0	100	53	53
Espaço próprio para estacionamento de viaturas dos visitantes	62,3	33	37,7	20	53
Espaço próprio para a recolha de animais vivos	1,8	1	98,2	56	57
Espaço próprio para a recolha de cadáveres	12,5	7	87,5	49	56

Legenda: N – número de explorações

Tabela A.3.4 – Resultados obtidos da avaliação de algumas medidas gerais de higiene.

Medidas gerais de higiene	Sim		Não		Total
	%	N	%	N	
Não caminha ou dirige veículos por cima de estrume/chorume enquanto executa operações de alimentação	84,1	53	15,9	10	63
Usa equipamentos diferenciados para manuseio de alimentos e de estrume/chorume	88,9	56	11,1	7	63
Utiliza tractores diferentes para tarefas de distribuição de alimentos e de transporte de estrume/chorume	30,0	15	70,0	35	50
Implementa medidas de biossegurança quando o mesmo tractor é utilizado para transporte de alimentos e de estrume/chorume	54,8	17	45,2	14	31

Legenda: N – número de explorações

Tabela A.3.5 – Caracterização das instalações da exploração.

Instalações	Sim		Não		Total
	%	N	%	N	
Camas subdimensionadas/desconfortáveis	34,0	16	66,0	31	47
Sistema de controlo da temperatura	39,6	21	60,4	32	53
Existência de enfermaria	82,5	52	17,5	11	63
Pedilúvio activo na enfermaria	2,0	1	98,0	49	50
Animais doentes ordenhados por último	80,4	41	19,6	10	51
Animais doentes ordenhados com ordenha móvel	78,4	40	21,6	11	51

Legenda: N – número de explorações

Tabela A.3.6 – Critérios para classificação das instalações quanto à luminosidade.

Classificação	Descrição
1 – Muito fraca	Local totalmente escuro; sem janelas nem iluminação artificial.
2 – Fraca	Visibilidade só nas horas do dia com mais luz; poucas janelas ou de pequena dimensão.
3 – Aceitável	Local menos iluminado do que o meio exterior, mas permite trabalhar a qualquer hora do dia.
4 – Boa	Local com iluminação natural igual ou praticamente igual à do meio exterior.

Legenda: N – número de explorações

Tabela A.3.7 – Critérios para a classificação das instalações quanto à ventilação.

Classificação	Descrição
1 – Muito fraca	Teias de aranha em grande quantidade; grande acumulação de pó; ambiente abafado e húmido.
2 – Fraca	Alguma quantidade de teias de aranha; alguma acumulação de pó.
3 – Aceitável	Pouca acumulação pó; eventualmente, teias de aranha apenas nos cantos.
4 – Boa	Ausência de teias de aranha ou de acumulação de pó.

Legenda: N – número de explorações

Tabela A.3.8 – Resultados da avaliação da densidade animal, espaço de manjedoura e espaço de bebedouro.

	Sobrepopulação			Manjedoura insuficiente			Bebedouro insuficiente		
	N	%	Total	N	%	Total	N	%	Total
Viteiro colectivo	4	8,9	45	2	4,4	45	3	6,7	45
Parque recria	9	20,9	43	6	13,6	44	8	18,2	44
Parque novilhas	7	20,0	35	6	16,7	36	7	19,4	36
Parque lactação	4	7,7	52	4	7,8	51	4	8,0	50
Parque secas	3	7,7	39	3	7,9	38	3	7,9	38

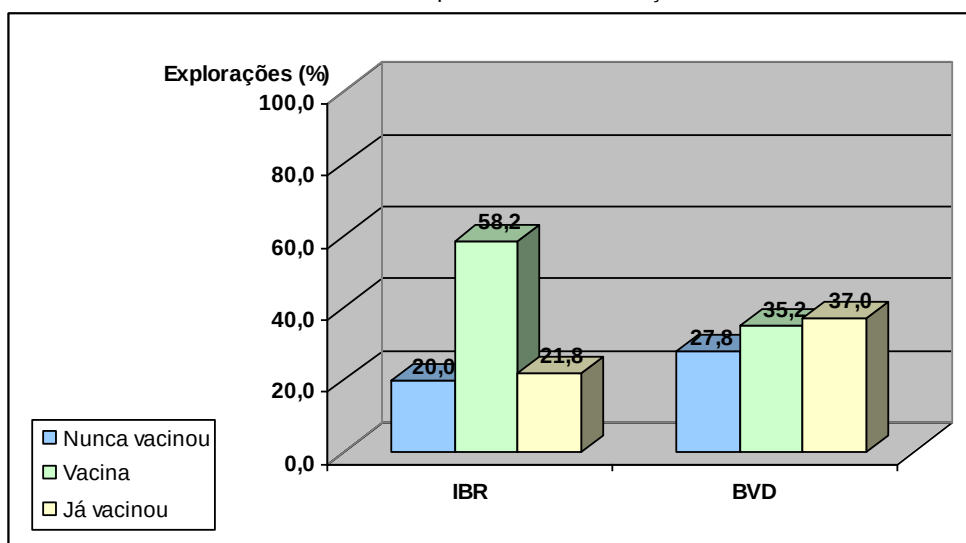
Legenda: N – número de explorações

Tabela A.3.9 – Resultados obtidos da avaliação de medidas de biossegurança relativas a equipamentos.

Equipamentos		Sim		Não		Total
		%	N	%	N	
Não costuma pedir equipamentos emprestados		75,0	39	25,0	13	52
Lava os equipamentos após cada utilização		88,2	45	11,8	6	51
Desinfecta os equipamentos após cada utilização		43,1	22	56,9	29	51
É utilizada uma luva de palpação nova por animal	Produtor	50,0	10	50,0	10	20
	Veterinário	21,2	11	78,8	41	52
	Técnico de IA	52,4	22	47,6	20	42
É utilizada uma agulha nova por animal	Produtor	32,0	16	68,0	34	50
	Veterinário	56,3	27	43,7	21	48

Legenda: N – número de explorações

Gráfico 1 – Práticas actuais e passadas de vacinação frente a IBR e BVD.



Anexo 4 – Medidas de Associação

Tabela A.4.1 – Valores de RR e OR de IBR e respectivos intervalos de confiança a 95%.

Factores de Risco para IBR	Com FR		Sem FR		RR	IC a 95% de RR		OR	IC a 95% de OR	
	S	N	S	N		Inf	Sup		Inf	Sup
Explorações vizinhas num raio de 1000m	30	16	5	3	1,0	0,59	1,86	1,1	0,24	5,33
Possível acesso de animais silvestres	23	14	12	5	0,9	0,59	1,31	0,7	0,20	2,36
Contacto com bovinos de outras explorações	1	1	38	23	0,8	0,20	3,25	0,6	0,04	10,15
Contacto com ovelhas ou cabras	5	1	31	20	1,4	0,90	2,09	3,2	0,35	29,68
Participação em feiras, exposições ou concursos	5	2	34	22	1,2	0,70	1,97	1,6	0,29	9,08
Introdução de novos animais	34	17	5	7	1,6	0,80	3,21	2,8	0,77	10,14
Importação de animais da EU	13	8	17	6	0,8	0,55	1,27	0,6	0,16	2,07
Não faz quarentena de novos animais	25	9	6	7	1,6	0,86	2,96	3,2	0,86	12,26
Não exige animais livres de IBR e BVD na compra	23	4	8	11	2,0	1,17	3,51	7,9	1,95	32,03
Não verificação certificados sanitários na compra	21	4	10	10	1,7	1,05	2,69	5,3	1,32	20,92
Desconhece o estatuto vacinal dos animais comprados	23	9	11	8	1,2	0,80	1,93	1,9	0,56	6,13
Não efectua controlos serológicos aos animais comprados	20	8	13	8	1,2	0,77	1,74	1,5	0,46	5,12
Recorre a cobrição natural	13	8	26	16	1,0	0,66	1,51	1,0	0,34	2,94
Compra de embriões	2	2	32	17	0,8	0,28	2,08	0,5	0,07	4,11
Desconhece origem dos embriões comprados	1	1	1	1	1,0	0,14	7,10	1,0	0,02	50,40
Espaço destinado à recolha de cadáveres ausente	31	18	6	1	0,7	0,51	1,07	0,3	0,03	2,58
Espaço destinado à recolha de animais vivos ausente	37	19	1	0	0,7	0,55	0,80	0,0		
Ausência de espaço estacionamento viaturas de visitantes	16	4	18	15	1,5	1,00	2,15	3,3	0,92	12,14
Inexistência de registo de entradas de veículos	38	24	1	0	0,6	0,50	0,75	0,0		
Não avaliação visual do estado de limpeza dos veículos	19	8	15	11	1,2	0,81	1,84	1,7	0,56	5,42
Inexistência de pedilúvio activo	32	18	2	1	1,0	0,42	2,19	0,9	0,08	10,50
Inexistência de equipamento próprio para visitantes	31	19	8	5	1,0	0,62	1,63	1,0	0,29	3,58
Fraca higiene da roupa/calçado do veterinário e técnico IA	6	3	30	18	1,1	0,64	1,78	1,2	0,27	5,40
Fraca higiene da roupa/calçado de outros técnicos	13	4	22	17	1,4	0,93	1,99	2,5	0,69	9,10
Inexistência de registo de entradas de pessoas	38	24	2	0	0,6	0,50	0,75	0,0		
Acesso de pessoas estranhas às instalações p.d.	19	8	21	16	1,2	0,85	1,80	1,8	0,63	5,18
Inexistência de placas informativas	32	16	2	3	1,7	0,56	4,97	3,0	0,45	19,80
Inexistência de local próprio para receber visitantes	20	10	14	9	1,1	0,72	1,66	1,3	0,42	3,98
Inexistência de plano de controlo de insectos	2	2	29	15	0,8	0,28	2,07	0,5	0,07	4,05
Inexistência de plano de controlo de pragas	7	4	29	17	1,0	0,61	1,66	1,0	0,26	4,02
Animais não alojados em função do grupo etário	4	0	35	23	1,7	1,35	2,04			
Uso de equipamentos indiferenciados para manejo de alimentos e para limpeza de camas/corredores/parques	5	2	34	22	1,2	0,70	1,97	1,6	0,29	9,08
Utilização do mesmo tractor para distribuir alimentos e para transportar estrume/chorume	23	12	11	4	0,9	0,61	1,32	0,7	0,18	2,66
Inexistência de medidas de biossegurança quando o tractor é usado no manejo de alimentos e de fezes	11	3	9	8	1,5	0,88	2,51	3,3	0,66	16,03
Caminha ou dirige veículos por cima de estrume ou chorumes enquanto executa operações de alimentação	8	2	31	22	1,4	0,93	2,01	2,8	0,55	14,68
Tamanho elevado do efectivo (mais de 100 animais)	17	5	12	10	1,4	0,91	2,21	2,8	0,77	10,43
Elevada densidade animal	10	4	20	14	1,2	0,79	1,88	1,8	0,46	6,72
Camas subdimensionadas/desconfortáveis	13	3	15	16	1,7	1,09	2,59	4,6	1,10	19,50
Não desinfecção baldes do leite após cada toma	25	16	9	3	0,8	0,54	1,22	0,5	0,12	2,22
Vitelos não separados da progenitora logo após o nascimento	8	7	31	17	0,8	0,49	1,39	0,6	0,19	2,03
Não administração do colostro aos vitelos nas primeiras horas de vida	4	2	32	19	1,1	0,58	1,94	1,2	0,20	7,11
Vitelos agrupados sem serem previamente identificados	10	5	29	19	1,1	0,72	1,69	1,3	0,39	4,44
Não existência de um plano de desparasitação (carraças)	9	6	30	18	1,0	0,60	1,53	0,9	0,27	2,95
O layout da exploração permite que estrumes/churumes entrem em contacto com os alimentos dos animais	24	12	15	12	1,2	0,80	1,81	1,6	0,57	4,47
Produtor desloca-se a outras explorações com a roupa e/ou calçado de trabalho	12	7	14	9	1,0	0,65	1,67	1,1	0,31	3,86
Não é realizada necrópsia aos animais que morrem de causa desconhecida	33	19	2	2	1,3	0,47	3,46	1,7	0,23	13,35
O sangue das vacas que abortam e/ou os fetos abortados não são enviados para laboratório	31	17	4	5	1,5	0,68	3,11	2,3	0,54	9,64
Reutilização de agulhas	27	12	7	7	1,4	0,79	2,43	2,3	0,65	7,85
Reutilização de luvas de palpação rectal	28	14	6	5	1,2	0,68	2,18	1,7	0,43	6,42
Não desinfecção de equipamentos após cada utilização	19	10	14	8	1,0	0,68	1,55	1,1	0,34	3,46
Hábito de pedir equipamentos emprestados	8	5	26	13	0,9	0,57	1,50	0,8	0,22	2,94
Inexistência de equipamentos básicos para uso pelo veterinário	17	13	16	6	0,8	0,52	1,17	0,5	0,15	1,60
Ausência de cuidados de desinfecção dos equipamentos que o veterinário traz consigo	5	4	9	9	1,1	0,53	2,34	1,3	0,25	6,23

Legenda: S - Suspeita; N - Negativa; Inf - Inferior; Sup – Superior; FR – factor de risco; RR – risco relativo; OR – odds ratio; IC – intervalo de confiança.

Tabela A.4.2 – Valores de RR e OR para BVD e respectivos intervalos de confiança a 95%.

Factores de Risco para BVD	Com FR		Sem FR		RR	IC a 95% de RR		OR	IC a 95% de OR	
	I/S	N	I/S	N		Inf	Sup		Inf	Sup
Explorações vizinhas num raio de 1000m	13	33	2	6	1,1	0,31	4,09	1,2	0,21	6,63
Possível acesso de animais silvestres	10	27	5	12	0,9	0,37	2,28	0,9	0,25	3,17
Participação em feiras, exposições ou concursos	4	3	14	42	2,3	1,04	5,01	4,0	0,80	20,10
Introdução de novos animais	17	34	1	11	4,0	0,59	27,18	5,5	0,65	46,20
Importação de animais da EU	4	17	10	13	0,4	0,16	1,19	0,3	0,08	1,20
Não faz quarentena de novos animais	11	23	4	9	1,1	0,41	2,72	1,1	0,27	4,28
Não exige animais livres de IBR e BVD na compra	8	19	6	13	0,9	0,39	2,26	0,9	0,26	3,26
Não verificação certificados sanitários na compra	6	19	8	12	0,6	0,25	1,45	0,5	0,13	1,71
Desconhece o estatuto vacinal dos animais comprados	10	22	7	12	0,8	0,39	1,85	0,8	0,24	2,57
Não efectua controlos serológicos aos animais comprados	11	17	5	16	1,7	0,68	4,03	2,1	0,59	7,29
Recorre a cobrição natural	10	11	8	34	2,5	1,16	5,39	3,9	1,22	12,22
Compra de embriões	2	2	13	36	1,9	0,64	5,58	2,8	0,35	21,73
Desconhece origem dos embriões comprados	1	1	1	1	1,0	0,14	7,10	1,0	0,02	50,40
Espaço destinado à recolha de cadáveres ausente	14	35	2	5	1,0	0,29	3,50	1,0	0,17	5,77
Espaço destinado ao estacionamento das viaturas dos visitantes ausente	3	17	12	21	0,4	0,13	1,29	0,3	0,07	1,27
Não avaliação visual do estado de limpeza dos veículos	7	20	8	18	0,8	0,36	1,99	0,8	0,24	2,61
Inexistência de equipamento próprio para fornecer a visitantes	11	39	7	6	0,4	0,20	0,84	0,2	0,07	0,87
Fraca higiene da roupa/calçado do veterinário e inseminador	1	8	14	34	0,4	0,06	2,55	0,3	0,03	2,66
Fraca higiene da roupa/calçado de outros técnicos	4	13	11	28	0,8	0,31	2,25	0,8	0,21	2,93
Acesso de pessoas estranhas às instalações p.d.	9	18	9	28	1,4	0,63	2,99	1,6	0,52	4,66
Inexistência de placas informativas	14	34	1	4	1,5	0,24	8,89	1,6	0,17	16,07
Inexistência de local próprio para receber visitantes/técnicos	8	22	7	16	0,9	0,37	2,06	0,8	0,25	2,76
Inexistência de plano de controlo de pragas	5	6	12	34	1,7	0,78	3,92	2,4	0,61	9,17
Uso de equipamentos indiferenciados para manejo de alimentos e para limpeza de camas/corredores/parques	1	6	17	39	0,5	0,07	3,02	0,4	0,04	3,42
Utilização do mesmo tractor para distribuir alimentos e para transportar estrume/chorume	11	24	5	10	0,9	0,40	2,24	0,9	0,25	3,33
Inexistência de medidas de biossegurança quando o tractor é usado no manejo de alimentos e de estrume/chorume	5	9	5	12	1,2	0,44	3,36	1,3	0,29	6,04
Caminha ou dirige veículos por cima de estrume/chorumes enquanto executa operações de alimentação	1	9	17	36	0,3	0,05	2,08	0,2	0,03	2,01
Tamanho elevado do efectivo (mais de 100 animais)	10	12	2	20	5,0	1,23	20,25	8,3	1,56	44,64
Elevada densidade animal	4	10	10	24	1,0	0,37	2,58	1,0	0,24	3,79
Camas subdimensionadas/desconfortáveis	2	14	12	19	0,3	0,08	1,27	0,2	0,04	1,18
Não desinfecção baldes do leite após cada toma	11	30	4	8	0,8	0,31	2,07	0,7	0,18	2,93
Vitelos não separados da progenitora logo após o nascimento	5	10	13	35	1,2	0,52	2,89	1,3	0,39	4,69
Não administração do colostro aos vitelos nas primeiras horas de vida	3	3	14	37	1,8	0,73	4,55	2,6	0,48	14,68
Vitelos agrupados sem serem previamente identificados	2	13	16	32	0,4	0,10	1,54	0,3	0,06	1,53
O layout da exploração permite que as fezes/estruques/churumes entrem em contacto com os alimentos dos animais	7	29	11	16	0,5	0,21	1,07	0,4	0,11	1,08
Produtor desloca-se a outras explorações com a roupa e/ou calçado de trabalho	7	12	7	16	1,2	0,52	2,84	1,3	0,37	4,83
Não é realizada necrópsia aos animais que morrem de causa desconhecida	14	38	2	2	0,5	0,18	1,58	0,4	0,05	2,87
O sangue das vacas que abortam e/ou os fetos abortados não são enviados para laboratório	14	34	2	7	1,3	0,36	4,81	1,4	0,27	7,81
Reutilização de agulhas	13	26	2	12	2,3	0,60	9,07	3,0	0,58	15,44
Reutilização de luvas de palpação rectal	14	28	1	10	3,7	0,54	24,94	5,0	0,58	43,07
Não desinfecção de equipamentos após cada utilização	11	18	4	18	2,1	0,77	5,68	2,8	0,74	10,27
Hábito de pedir equipamentos emprestados	5	8	9	30	1,7	0,68	4,08	2,1	0,54	7,98
Inexistência de equipamentos básicos para uso pelo veterinário	6	24	9	13	0,5	0,20	1,17	0,4	0,11	1,24
Ausência de cuidados de desinfecção dos equipamentos que o veterinário traz consigo	1	8	6	12	0,3	0,05	2,37	0,3	0,03	2,49

Legenda: I – Infectada; S – Suspeita; N – Negativa; Inf – Inferior; Sup – Superior; FR – factor de risco; RR – risco relativo; OR – odds ratio; IC – intervalo de confiança.

Tabela A.4.3 – Lista de factores de risco de IBR para os quais não foram determinados riscos relativos e/ou *odds ratio*.

IBR - não foram determinados RR e/ou OR para:	Motivo
Utilização de sala de ordenha colectiva	A única exploração com o factor de risco é negativa.
Utilização de pastos comunitários	
Inexistência de rodilúvio activo	Factores não observados em nenhuma exploração.
Veículos não são lavados à entrada na exploração	
Veículos não são lavados à saída da exploração	Todos os touros foram testados no âmbito do programa.
Desconhece estatuto sanitário do touro reprodutor	
Animais não alojados em função do grupo etário	Todas as explorações com o factor de risco são suspeitas.

Tabela A.4.4 – Lista de factores de risco de BVD para os quais não foram determinados riscos relativos e/ou *odds ratio*.

BVD - não foram determinados RR e/ou OR para:	Motivo
Contacto bovinos de outras explorações	As únicas explorações com o Factor de Risco são negativas.
Contacto com ovelhas	
Utilização de sala de ordenha colectiva	
Utilização de pastos comunitários	Factores não observados em nenhuma exploração.
Inexistência de rodilúvio activo	
Veículos não são lavados à entrada na exploração	
Veículos não são lavados à saída da exploração	Todos os touros foram testados no âmbito do programa de saúde animal.
Desconhece estatuto sanitário do touro reprodutor	
Inexistência de espaço próprio destinado à recolha de animais vivos	A única exploração com local para recolha de animais vivos é negativa.
Inexistência de registo de entradas de veículos	A única exploração com registo de entradas de veículos é negativa.
Inexistência de pedilúvio activo	As únicas explorações com pedilúvio são negativas.
Inexistência de registo de entradas de pessoas	As únicas explorações com registo de entradas de pessoas são negativas.
Inexistência de plano de controlo de insectos	Todas as explorações com Factor de Risco são negativas.
Animais não alojados em função do grupo etário	