

**U. PORTO**



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR  
UNIVERSIDADE DO PORTO

Relatório Final de Estágio  
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**DIARREIA VIRAL BOVINA  
IMPLEMENTAÇÃO DE UM PROGRAMA DE CONTROLO E  
BIOSSEGURANÇA NA IRLANDA**

Viviana Andreia Santos Mota

Orientador: Carla Maria Proença Noia de Mendonça

Co-Orientador: Regina Sayers

Porto 2009

**U. PORTO**



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR  
UNIVERSIDADE DO PORTO

Relatório Final de Estágio  
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**DIARREIA VIRAL BOVINA  
IMPLEMENTAÇÃO DE UM PROGRAMA DE CONTROLO E  
BIOSSEGURANÇA NA IRLANDA**

Viviana Andreia Santos Mota

Orientador: Carla Maria Proença Noia de Mendonça

Co-Orientador: Regina Sayers

Porto 2009

# Resumo

A diarreia viral bovina (BVD) é uma doença infecciosa dos bovinos causada pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) que afecta a maioria das explorações de bovinos. Este vírus está presente em todas as secreções e excreções corporais do animal infectado, tais como secreções nasais, orais, urina ou mesmo sémen, sendo a transmissão efectuada mediante contacto directo dos animais. As infecções por BVDV têm um maior impacto se ocorrerem na época de reprodução ou durante a gestação.

Existem 2 tipos de infecção por BVD: infecção viral transitória ou aguda e infecção viral persistente. Se a infecção ocorrer nos primeiros 120 dias de gestação, nasce um animal persistentemente infectado (PI), excretando o vírus durante toda a sua vida, sendo a fonte de infecção numa exploração. Estes animais são incuráveis e devem ser eliminados o mais rápido possível, mal sejam diagnosticados.

Este estágio tem como objectivo o estudo da prevalência de infecção por BVD nas explorações alvo do estudo na Irlanda, e a elaboração de um programa de controlo e biossegurança relativo a esta mesma doença. Pretende também estudar o impacto que BVD teve na performance reprodutiva e saúde dos vitelos, num grupo de animais naive, nunca antes expostos ao BVDV. Para isso, testaram-se todos os animais em estudo para antigénio (PCR), utilizando amostras de sangue, de modo a identificar todos os animais PI e, posteriormente, eliminá-los das explorações.

Devido às perdas económicas que BVD provoca numa exploração, torna-se necessário a implementação de um programa de sanidade animal.

Para que um programa de controlo de uma doença infecciosa funcione são necessários três componentes: Diagnóstico, Vacinação e Biossegurança. A vacinação por si só não é garantia para a prevenção de BVD.

# Agradecimentos

Antes de tudo queria agradecer à minha família, especialmente aos meus pais, por todo o apoio que me deram durante o curso, incentivando-me a continuar, mesmo nas horas mais difíceis.

Aos meus irmãos, Pedro e Ricardo, que sempre me apoiaram e acreditaram em mim.

Queria agradecer a todos os meus amigos, por todo o carinho e apoio.

Às minhas grandes amigas das ilhas, Andreia e Joana, por todo o companheirismo desde os primeiros dias de faculdade. Por todos os momentos bons e menos bons por que passamos, sempre estivemos presentes e sempre nos apoiamos.

Aos meus grandes amigos, Luisinho, Virgin, Nita, Joana Matos, e claro à Tem Tem, por todas as noites divertidas que tivemos ao longo deste percurso e às fantásticas risadas que podiam durar nem sei bem quanto tempo.

À minha amiga e parceira de urgências Patrícia, por me ajudar a superar as fatídicas urgências de CAC, que sem ela seriam um pesadelo.

À minha grande amiga Rhiannon por todos estes anos de amizade.

Ao João, por ter aparecido na minha vida numa altura mais stressante e ter conseguido afastar todos os maus pensamentos. Espero que o caminho que iremos percorrer de agora em diante seja cada vez melhor.

Queria agradecer à minha orientadora, Carla Mendonça, por toda a simpatia e ajuda dispensada na elaboração deste relatório.

Queria agradecer a todos na Associação de Jovens Agricultores Micaelenses (AJAM), especialmente à Sofia, ao Nuno, ao Huguinho, ao Pedro e ao Hélio, pelo fantástico ambiente proporcionado durante o meu estágio extra-curricular realizado na maravilhosa ilha de S. Miguel, a minha terra natal.

Queria agradecer a minha co-orientadora, Riona Sayers, por toda a ajuda e apoio incondicional que dedicou durante toda a minha estadia em Moorepark. Por todos os ensinamentos e conhecimento que me transmitiu, e claro, por todos os momentos caricatos que passamos juntas.

A todos em Moorepark, especialmente ao Cathal, Thomas, Brian e Phil por todas as brincadeiras e momentos bem passados.

À Finola, ao Jonathon e Nicola, por toda a ajuda prestada nos diversos trabalhos que tive de desenvolver. À Ann, por toda a sua simpatia e por estar sempre preocupada com o meu bem-estar e a todos os técnicos pela ajuda preciosa que me deram.

Não podia, claro, deixar de agradecer à família O'Connor, especialmente à Keara, por toda a simpatia e amizade, e por me terem recebido da melhor maneira possível.

A todos vocês, o meu sincero obrigado!

# Índice

Revisão Bibliográfica .....	1
-Transmissão .....	1
-Sinais Clínicos .....	4
-Diagnóstico .....	5
-Controlo .....	7
Introdução .....	8
Material e Métodos .....	9
Resultados / Discussão .....	11
-Determinar estado sanitário de uma exploração .....	16
-Implementar um plano de Biossegurança .....	17
-Vacinação .....	18
Conclusão .....	19
Lista de Abreviaturas .....	20
Bibliografia .....	20

## Revisão bibliográfica

A diarreia viral bovina (BVD) é uma doença infecciosa dos bovinos causada pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV), pertencente à família *Flaviviridae*, membro do género *Pestivirus* (Valle *et al.* 1999; Moenning *et al.* 2006).

BVDV apresenta dois biótipos designados por não citopáticos (BVDV nc) e citopáticos (BVDV c), dependendo do efeito que tem em tecidos celulares, em que o tipo não citopático é o mais comum e mais importante, visto ser o que atravessa a placenta e infecta o feto (Brownlie 2002). São considerados dois genótipos, o BVDV1 (forma mais isolada) e BVDV2 (forma mais atípica), sendo o BVDV1 o genótipo utilizado em vacinas e testes de diagnóstico (Quinn *et al.* 2002).

A maneira como se apresenta numa exploração leiteira é de tal forma diversificada e subtil que se torna complicado a sua detecção.

BVD ocorre na maioria dos países produtores de bovinos, causando perdas económicas bastante significativas na indústria (Wilke *et al.* 2003).

O custo despendido na fertilidade, saúde dos vitelos e na produção em geral dos bovinos, faz do BVD uma das doenças com maior impacto económico nas explorações de hoje. Assim sendo, diversos países decidiram fazer um estudo epidemiológico e relação custo/ benefício, com o objectivo de iniciar a erradicação ou um programa de controlo desta mesma doença. (Wilke *et al.*, 2003)

### **Transmissão:**

O vírus da diarreia viral bovina (BVDV), está presente em todas as secreções e excreções corporais do animal infectado, tais como secreções nasais, orais, urina ou mesmo sémen, e a transmissão é feita mediante contacto directo dos animais (Valle *et al.* 1999; Lindberg & Niskanem 2003).

Infecções por BVDV têm um maior impacto se ocorrerem na época de reprodução ou durante a gestação.

Existem 2 tipos de infecção por BVD:

- Infecção viral transitória (TI) ou aguda
- Infecção viral persistente (PI)

A maioria das infecções virais transitórias não resultam na manifestação de sinais clínicos, podendo, no entanto, se a infecção for severa, resultar na morte do animal. Após

um período curto de incubação, animais TI tornam-se virêmicos, e o vírus pode ser excretado em todas as secreções e excreções corporais desde o 4º dia até aproximadamente ao 15º dia pós-infecção (Larson 2005). Após essa infecção o animal desenvolve imunidade para a vida (Sayers 2008).

Se a infecção ocorrer durante os primeiros 120 dias de gestação pode induzir imunotolerância do feto à estirpe do BVDV que infectou a progenitora, resultando no nascimento de um vitelo a que chamamos de persistentemente infectado (PI). (Zimmer *et al.* 2004; Valle *et al.* 1999).



**Figura 1:** Animal PI

O feto reconhece o vírus como parte do seu sistema imunitário, pois só a partir dos 180 dias gestação, o feto torna-se imunocompetente. (Radostits & Littlejohns 1988)

Se a infecção ocorrer aproximadamente depois dos 4 meses de gestação, normalmente resulta numa infecção fetal transitória, com o desenvolvimento de uma resposta imune por parte do feto, havendo uma produção de anticorpos específica e eliminação do vírus. (Anderson 2007).

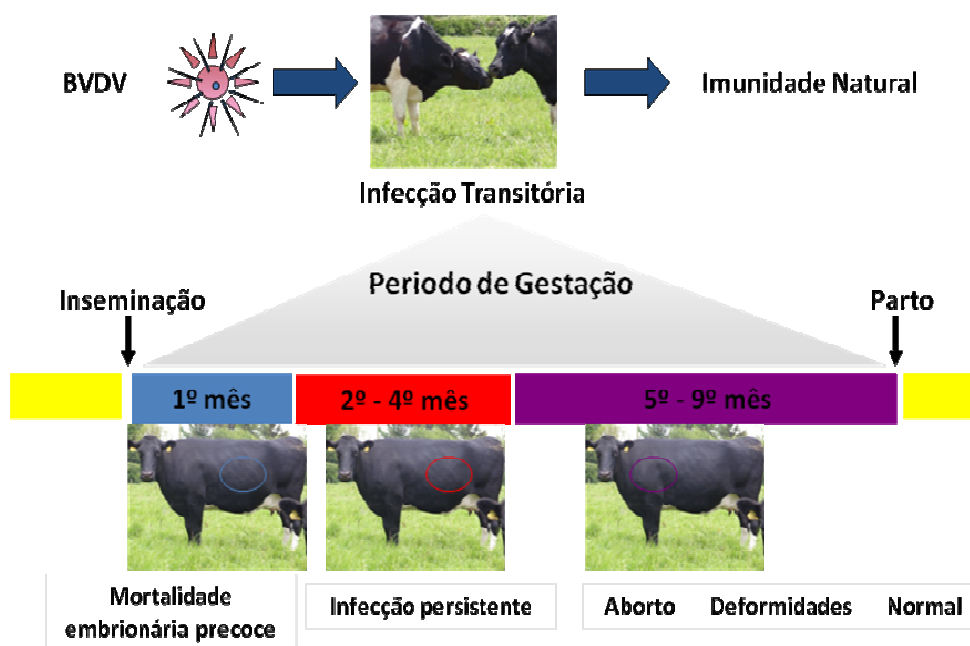
O feto pode então ser infectado por via transplacentária (vertical) a partir de uma progenitora infectada, quer esta esteja infectada persistentemente ou transitoriamente. (Radostits & Littlejohns 1988). Esta é uma das poucas situações em que a transmissão do vírus é eficiente, a partir de um animal infectado transitoriamente, ou seja, um animal TI pode perfeitamente originar um animal PI. Segundo Lindberg & Houe (2005), um animal PI origina sempre um animal PI. Os animais PI são a principal fonte de infecção numa população bovina, pois excretam grandes quantidades de vírus durante toda a sua vida. (Zimmer *et al.* 2004; Valle *et al.* 1999). Os animais TI são considerados como sendo menos eficientes a transmitir o vírus a animais susceptíveis. No entanto, a seroconversão



entre animais que não estejam na presença de animais PI, indica que a transmissão através de animais TI ocorre, apesar de ser uma transmissão mais lenta (Larson 2005).

Segundo Brownlie (2002), BVDV raramente infecta fetos de animais seropositivos. Somente durante a virémia de uma infecção aguda ou persistente em animais seronegativos é que o vírus invade os placentomas e replica nos trofoblastos, antes de seguir para o feto.

Os animais PI não têm cura possível, e podem parecer perfeitamente saudáveis ou com um crescimento inferior ao normal para a idade. Estes animais têm uma vida mais curta, em que a mortalidade ocorre entre os 6 e os 18 meses de idade (Valle *et al.* 1999). Segundo este mesmo autor, algumas fêmeas PI podem atingir a idade reprodutiva e dar origem a um vitelo PI. BVDV é muitas vezes introduzido numa exploração susceptível pela compra de animais PI ou animais gestantes, que carregam animais PI (Houe 1999).



**Figura 2:** Tipos de infecção por BVDV

A transmissão também pode ocorrer através de fomites. Foram relatados casos de infecção através de luvas de palpação retal e agulhas hipodérmicas, recentemente utilizadas em animais PI. (Anónimo 2000). O vírus pode ser transmitido através de inseminação artificial, usando um sêmen de touro PI ou mesmo TI. Touros PI podem

produzir sémen de qualidade aceitável, no entanto são normalmente associados a uma baixa fertilidade (Fray *et al.* 2000).

### **Sinais clínicos:**

A infecção por BVDV é normalmente uma infecção subclínica ou então causadora de sinais clínicos não muito específicos (Thobokwe *et al.* 2004).

BVD tem o seu maior impacto na diminuição da fertilidade numa exploração. (Laven 2008). A infecção por BVDV no primeiro trimestre de gestação, pode causar infertilidade, morte embrionária, reabsorção fetal, mumificação ou mesmo aborto. (Anderson 2007).

Segundo Sayers (2008), BVD manifesta-se numa exploração de diversas formas, desde a diminuição da taxa de concepção, aumento do número de abortos, nascimento de fetos mortos e fetos deformados, aumento de retenções de placenta e ocasionalmente uma diminuição da produção de leite.

BVDV pode causar defeitos congénitos em vitelos. Os defeitos congénitos mais observados são hipoplasia cerebral, anormalidades oculares, tal como atrofia da retina, neurite óptica, cataratas e microftalmia com displasia da retina. (Radostits & Littlejohns 1988)

A doença das mucosas é a principal manifestação da diarreia viral bovina. Esta ocorre quando um animal PI é superinfectado com a forma citopática do vírus. Ocorre por volta dos 6 aos 18 meses de idade e é caracterizada por perda de peso e diarreia. (Laven 2008).

Segundo Laven (2008), a infecção por BVDV é extremamente imunossupressiva, por isso os animais mais jovens ao serem infectados por este vírus, ficam mais sujeitos a infecção por outras doenças infecciosas, nomeadamente doenças respiratórias ou entéricas. BVDV pode existir na presença de outros agentes infecciosos, tal como Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR), Parainfluenza (PI-3) ou mesmo *Pasteurella* spp, o que pode indicar que existe sinergismo entre eles. (Radostits & Littlejohns 1988; Brownlie 2000).

Além dos efeitos directos, BVDV tem impacto no estado geral de saúde de uma exploração, tal como o aumento de diarreias e pneumonias em vitelos e potencialmente mais mamites (Sayers, 2008).

## **Diagnóstico**

A identificação de todos os animais infectados com BVD é um dos passos mais importantes para que um programa de controlo funcione. O método de diagnóstico escolhido vai depender de diversos factores. Deve-se ter em conta a idade do animal a ser testado, se o teste é feito ante ou pós-mortem e se se pretende identificar animais tanto PI como TI.

Existem diversos métodos de diagnóstico no mercado, desde o isolamento viral a partir de soro, sangue ou outras amostras de tecido, mancha de anticorpos fluorescente (FA) a partir de tecidos, procura de antigénios virais por imunohistoquímica a partir de biopsia de pele (IHC), captura de antigénios por ELISA aplicado a soro, plasma ou solução tampão de fosfato de biopsia de pele (BonDurant 2007; Larson 2007). O teste de ELISA detecta um tipo de anticorpos contra a proteína P80, proteína que é detectada quando há replicação viral. A P80 está presente quando ocorre uma infecção natural ou quando o animal foi vacinado com uma vacina viva. Este teste é utilizado para diferenciar animais que foram vacinados com uma vacina inactivada (P80 negativo) dos que foram infectados (P80 positivo). Um outro método de diagnóstico é RT-PCR (detecção de antigénio), e segundo Zimmer *et al.* (2004) consegue dar resultados positivos mesmo na presença de um elevado título de anticorpos. É considerado um dos melhores testes para programas de erradicação.

Muitos destes testes, tal como isolamento viral, RT-PCR e ELISA, somente detectam a virémia, não sendo capazes de diferenciar um animal PI de um TI. Para isso, os animais testados positivamente terão de ser sujeitos a um novo teste, 3- 4 semanas depois, de modo a poder diferenciar uma infecção persistente de uma transitória (Larson 2005). Um animal PI na maioria das vezes ao testar-se para anticorpos é seronegativo, visto reconhecer o vírus como fazendo parte do seu sistema imunitário. A fêmea gestante ao ser testada para antigénio, pode ser seronegativa, a não ser que ela própria seja um animal PI. Por isso mesmo deve-se testar sempre o vitelo depois de nascer, pois a mãe pode estar a carregar um PI.

O diagnóstico de BVDV/ doenças associadas pode parecer muito complexo no início mas, prestando atenção ao desenvolvimento da doença e planeando a melhor estratégia para o diagnóstico, pode ajudar a maximizar a informação obtida e minimizar os

custos. A seguinte tabela, explica a razão para a realização dos testes de diagnóstico primários.

**Tabela 1.** Relação entre os diferentes motivos e testes de diagnóstico

<b>Motivo para Teste</b>	<b>Teste antigénio</b>	<b>Teste anticorpos</b>
Vitelos doentes	Testar todos animais para identificar PI	Testar amostra se não se encontrar PI
Problemas de Fertilidade	Quando existir história de aborto ou baixa fertilidade	Comparação de animais afectados e não afectados
Doença das Mucosas	Todos os casos	Sem efeito
Rastreio	Testar todos animais para identificar PI	Testar amostras para identificar susceptibilidade BVDV

Fonte: (Laven 2008)

Ao testar vitelos para identificar PI, deve-se ter em atenção a interferência do nível de anticorpos maternal. Segundo Zimmer *et al.* (2004), quanto maior o título de anticorpos, menor a frequência de resultados positivos obtidos a partir de isolamento viral.

Amostras de pele para captura de antigénio viral por IHC ou AC-ELISA e isolamento viral a partir de buffy coat (duas amostras com intervalo de 3 a 4 semanas) são os melhores testes para minimizar o risco de resultados falsos negativos (Larson 2005).

Ao testar animais mais velhos pode-se considerar fazer pools de amostras de sangue para PCR. Todos os animais que sejam PI positivo devem ser testados novamente para determinar o seu grau de virémia (repetir isolamento viral ou PCR a partir de soro ou sangue) pelo menos 3 a 4 semanas depois do primeiro teste. Um laboratório qualificado e com experiência em testes de BVD, ao usar testes com elevada especificidade para identificar PI em populações com relativa baixa prevalência de PI, muito dificilmente terá resultados falsos positivos.

Resultados falsos positivos PI parecem aparecer mais em explorações em que o número de animais PI é elevado e em que o risco de BVDV é maior, isto é, animais TI a aparecerem como animais PI (Larson 2005).

**Controlo:**

O controlo desta doença numa exploração passa primeiramente pela determinação do estado sanitário do BVD da mesma, pela implementação de um plano de biossegurança e um plano de vacinação adequado (Sayers, 2008).

Biossegurança é a implementação de um conjunto de medidas que vão ajudar na prevenção da introdução e disseminação de doenças infecciosas (Gunn et al. 2008). Pode ser aplicado quer a nível nacional, evitando a entrada de doenças infecciosas num país, quer a nível de uma exploração individual, acautelando a entrada e disseminação de doenças infecciosas. Quanto maior a prevalência de uma doença num país, mais restritas terão de ser as medidas de biossegurança aplicadas, de modo a reduzir o risco de entrada da doença.

Num programa de controlo deve-se ter em atenção todos os factores de risco, tais como: existência de animais PI, animais gestantes que podem estar a carregar um feto PI ou animais TI. Ter atenção também à entrada de material infectado na exploração, como sémen e vacinas.

Relativamente a vacinação, existem diversos tipos de vacinas no mercado, desde vacinas vivas modificadas a vacinas inactivadas. As vacinas vivas modificadas podem ter um efeito na função dos linfócitos e neutrófilos. Logo, animais que estejam em stress, não devem ser sujeitos a uma vacinação com este tipo de vacina, pois pode potenciar outro tipo de infecções virais ou bacterianas.

O sucesso de qualquer programa de erradicação de BVDV depende da capacidade de detectar todos os PI numa idade bastante jovem (Zimmer *et al.*, 2004) e eliminá-los da exploração (Wilke *et al.* 2003). Há quem fale em utilizar animais PI como vacinas naturais numa exploração, em que estes podem diminuir o número de animais susceptíveis (seroconversão) (Anónimo 2000). Mas outros autores afirmam que é muito arriscado, principalmente se existirem animais gestantes (início da gestação) na exploração, pois pode levar a grandes perdas económicas, nomeadamente abortos (Lindberg & Houe 2005).

Tanto os programas de vacinação como a existência de PI na exploração, são responsáveis pelos animais seropositivos na exploração.

Os programas de controlo e biossegurança devem ser aplicados após se conhecer a história epidemiológica da exploração e após serem feitos os diagnósticos de forma a identificar os grupos e comportamentos de risco e, assim, implementar medidas que visam evitar o aparecimento ou o reaparecimento da doença na exploração. Estas medidas devem ir de encontro com as características de cada exploração, como por exemplo o tipo de

instalações, manejo e valor genético dos animais, não existindo portanto um protocolo nem medidas de biossegurança universais.

## **Introdução**

Estima-se que 80 a 90% das explorações de bovinos na Irlanda terão sido expostas ao BVDV, apesar de não se conhecer a sua verdadeira prevalência na Irlanda. O facto de haver um número tão elevado de explorações expostas a esta doença, está relacionado com a não existência de um programa de controlo apropriado de BVD.

Este projecto tem como objectivo estudar a prevalência de infecção por BVD nas explorações alvo do estudo e elaborar um programa de controlo e biossegurança relativo a esta mesma doença.

Pretende também estudar o impacto que BVD teve na performance reprodutiva e saúde dos vitelos, num grupo de animais “naive”, nunca antes expostos ao BVDV.

Como caso de estudo, aproveitou-se o facto de estar a ocorrer um surto de BVD num grupo de novilhas de primeira lactação, que pariram no Outono de 2008.

Todo este trabalho foi realizado no Moorepark Research Centre (Dairy Production Division), um dos centros de investigação mais conceituados do Mundo. É especializado no desenvolvimento de sistemas de melhoramento da produção leiteira, acompanhando o progresso da indústria, e ajudando a melhorar a competitividade dos produtores irlandeses no mercado global. Estes sistemas incluem estudos de fertilidade, nutrição de bovinos de leite e produção de erva.

Moorepark durante os últimos anos tem investido e desenvolvido os sistemas acima referidos, mas a sanidade animal, isto é, o controlo de doenças infecciosas não tem sido uma prioridade. Assim, no ano de 2008, decidiu-se apostar no estudo da incidência / prevalência das doenças infecciosas que têm um maior impacto nas explorações leiteiras da Irlanda e, conseqüentemente, implementar um programa de controlo e biossegurança destas mesmas doenças. Decidiu-se apostar no controlo das seguintes doenças: Diarreia viral bovina (BVD), Salmonelose (*Salmonella dublin*), Leptospirose (*Leptospira hardjo*), Paratuberculose, Neosporose (*Neospora caninum*), Micoplasmose (*Mycoplasma bovis*) e Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR). Todas estas patologias são alvo do estudo do novo projecto levado a cabo por Moorepark, “HERD AHEAD”. Mas, devido ao facto de durante o ano de 2008 BVD estar a provocar grandes perdas económicas aos produtores irlandeses, o programa tem-se centrado mais nesta patologia.

## Material e Métodos

Moorepark tem a seu cargo sete explorações, utilizando mais de 320 hectares e cerca de 1000 animais. Todas estas explorações são alvo de estudos de investigação e estão representadas na seguinte tabela (tabela 2).

**Tabela 2:** Explorações pertencentes a Moorepark

Explorações em estudo				
Nome	Objectivo	Localização	Área (ha)	Número Animais
<a href="#">Ballydaque</a>	Avaliação de Cruzamentos Genéticos	Co. Cork	93	167
<a href="#">Ballyhaise</a>	Produção de Leite Regional	Co. Cavan	47	97
<a href="#">Curtins</a>	Sistemas de Exploração	Co. Cork	48	140
<a href="#">Kilmaley</a>	Produção de Leite Regional	Co. Clare	42	50
<a href="#">Kilworth</a>	Investigação Ambiental	Co. Cork	93	100
<a href="#">Moorepark</a>	Principal Centro de Investigação	Co. Cork	100	300
<a href="#">Solohead</a>	Eficiência na Utilização de Nutrientes	Co. Tipperary	52	95
<a href="#">Johnstown Castle</a>	Produção Leite na época de Inverno	Co. Wexford	30	80

Fonte: (www.teagasc.ie)

Todas as explorações situam-se maioritariamente no sul do país, e podem ser visualizadas na Figura 3.



**Figura 3:** Localização das explorações de Moorepark

Fonte: (www.teagasc.ie)

Um total de 88 animais gestantes, pertencentes à exploração de Moorepark, pariu no Outono de 2008 e foi alvo do estudo desde o início da Primavera de 2008. Este grupo consistiu, inicialmente, de 48 vacas e 47 novilhas, todas elas de raça Holstein/ Frísia. Dado que das 47 novilhas, somente 40 pariram vitelos vivos, consideramos como grupo de estudo então os 88 animais que geraram animais vivos.

O grupo de vacas e o grupo de novilhas tiveram um maneio distinto, estando os dois grupos separados. Os 48 animais (grupo de vacas) juntaram-se a um outro grupo de vacas que pariu na Primavera, enquanto as novilhas tiveram um maneio separado de todos os outros animais.

Na época reprodutiva de 16 Novembro de 2007 a 23 Fevereiro de 2008 (14 semanas), o grupo de 47 novilhas Holstein/ Frísia foi apresentado, pela primeira vez, à cobrição por inseminação artificial, originando vitelos nascidos no Outono de 2008. O grupo de vacas (n=48) e o grupo de novilhas (n= 47) só entrou em contacto na época de cobrição, ou seja, antes de começarem a parir, estando o grupo de vacas vacinadas contra BVD, com uma vacina inactivada.

Um programa de controlo de BVD foi iniciado em Julho de 2008 em Moorepark, relativamente aos grupos de animais que pariram na Primavera e no Outono desse mesmo ano, procurando identificar todos os animais PI.

Este programa consistiu em testar todos os animais da exploração, incluindo os vitelos nascidos subsequentemente ao teste inicial, até mesmo os vitelos nascidos do grupo



das novilhas. Para a realização destes testes, colheram-se amostras de sangue a partir da veia coccígea dos animais adultos e da veia jugular de todos os vitelos nascidos vivos (n=88), utilizando tubos de vácuo e tendo o cuidado de utilizar uma agulha para cada animal. Todos os vitelos foram testados antes das duas semanas de idade. O peso de todos os vitelos foi registado à nascença, sendo estes, criados separadamente dos restantes animais, em pequenos cubículos individuais com possível contacto entre si.

A performance reprodutiva destas novilhas a parirem no Outono de 2008 foi determinada, com base nos seguintes parâmetros: taxa de concepção ao primeiro serviço, número de serviços por concepção e percentagem de animais vazios.

As amostras de sangue foram analisadas para detecção de antigénio, usando RT-PCR em tempo real, recorrendo a um laboratório privado de diagnóstico veterinário (EnferGroup). O teste de PCR que este laboratório utiliza é o BoVir®, e consegue identificar e diferenciar entre um animal PI e TI, dando os resultados em apenas dois dias. Este teste tem uma elevada sensibilidade e especificidade e não tem interferências com os anticorpos maternos, o que leva a uma detecção viral o mais precoce possível.

A escolha deste laboratório em detrimento de outro, nomeadamente o Laboratório Central de Veterinária (Backweston), deveu-se ao facto de se obter os resultados com maior rapidez.

Todos os animais com resultado positivo para a presença de vírus, foram isolados e sujeitos a um novo teste 3 a 5 semanas após o teste inicial.

O estado sanitário de todos os vitelos nascidos do grupo de animais que pariu no Outono foi acompanhado e monitorizado durante as quatro semanas após o nascimento.

Todos os dados recolhidos durante este estudo foram inseridos no programa Oracle Database, desde o número de animais PI e TI, até dados relacionados com a fertilidade e produção de leite.

## **Resultados / Discussão**

Todas as novilhas gestantes testadas tiveram resultados negativos relativamente ao teste do antigénio (PCR). Na altura, foi excluída a possibilidade da existência de um animal PI nesse mesmo grupo, mesmo tendo sido refugados animais PI no grupo de vacas que pariu na Primavera de 2008.

Foi observada uma diminuição da performance reprodutiva no grupo das novilhas, durante a época reprodutiva (tabela 4), com taxas de concepção ao primeiro serviço abaixo

do valor esperado (49%). O número total de serviços por concepção foi de 88, significando 2,1 serviços por concepção, valor acima do esperado. Um total de seis novilhas não ficou gestante, apresentando uma percentagem de animais vazios de 13%. Das 41 novilhas gestantes, 40 pariram vitelos vivos, uma abortou e três vitelos morreram no espaço de uma semana.

**Tabela 4.** Performance reprodutiva do grupo de novilhas no Outono 2008

<b>Parâmetros de Fertilidade</b>	<b>Actual</b>	<b>Esperado *</b>
Taxa Concepção 1º serviço	49%	>60%
Nº serviços por concepção	2.1	<1.5
% Animais vazios	13%	<5%
*(Mee et al., 1999)		

Dos 40 vitelos nascidos vivos do grupo das novilhas, 16 vitelos tiveram resultados positivos ao vírus BVD. Ao repetir o teste 3 a 5 semanas depois, 14 desses vitelos mantiveram os resultados positivos, tendo 2 deles alterado o seu estado, sendo classificados como animais TI (tabela 5). Os 14 vitelos foram classificados como animais PI, tendo todos eles como progenitora as novilhas.

Estes resultados indicam uma percentagem de animais PI, todos nascidos do grupo de novilhas de primeira lactação, na ordem dos 35%.

**Tabela 5:** Infecção do vírus BVD no grupo de vitelos das novilhas (Outono 2008)

<b>N</b>	<b>Negativo</b>	<b>PI</b>	<b>TI</b>
40	24	14	2
CT (média)	Sem valor	24,15	34,3

Este valor CT, representa o primeiro ciclo, durante o teste de PCR, em que ocorre a detecção do vírus.

Os vitelos foram todos pesados à nascença e, a partir desses valores, foi calculada a média dos pesos. Como esperado, devido à patologia do BVD, a média do peso à nascença dos animais PI foi de 5 Kg mais baixa que a média de pesos dos vitelos não PI (P=0.007) (Tabela 6).

**Tabela 6:** Média de peso à nascença do grupo de vitelos das novilhas (Outono 2008)

n	Grupo não	
	PI	Grupo PI
40	26	14
Média de peso à nascença (Kg)	37 ( 0.7 )*	32 ( 1.5 )*

(P= 0,007) \*

Foram registados surtos tanto de diarreia como de doença respiratória na população de vitelos nascidos no Outono de 2008. Antes da remoção dos animais PI, aproximadamente 50% de todo o grupo de vitelos foi afectado com diarreia e /ou doença respiratória.

Do grupo total de vitelos (n= 88), seis vitelos nasceram mortos e onze morreram após uma semana de vida.

Após se ter registado todos estes resultados, chegou-se à conclusão que o grupo de novilhas foi infectado na época da cobrição, altura em que ambos os grupos entraram em contacto. Apesar de as vacas estarem vacinadas com uma vacina inactivada de BVD, estas foram infectadas antes da época reprodutiva. Este facto, só pode ser explicado pela existência de animais PI que entraram em contacto com o grupo de 48 vacas, quando estas estiveram misturadas com o outro grupo de vacas que pariu na altura da Primavera. Estes animais PI não foram detectados na altura em que os testes começaram, sendo um grave problema, pois excretam uma enorme quantidade de vírus, aumentando o nível de infecção, infectando assim todos os animais seronegativos. Mesmo os animais estando

vacinados, a carga de vírus que um animal PI excreta é de tal maneira elevada, que uma vacina não consegue competir com tal excreção.

Em 1997, foi descoberto o primeiro caso de Encefalopatia Espongiforme Transmissível (BSE) na exploração de Moorepark, sendo posteriormente sujeita a vazio sanitário. Em 1998, toda a exploração foi repopulada e, desde então, todos os animais comprados são testados para Tuberculose, Brucelose, Diarreia Viral Bovina, Paratuberculose, Neosporose, Salmonelose, Rinotraqueíte Infecciosa Bovina, Mycoplasmoses e Leptospirose.

O aparecimento de animais PI no grupo das vacas que pariu na Primavera, deve-se ao facto de terem sido comprados animais gestantes e estes terem sido misturados com os já existentes na exploração. As fêmeas gestantes compradas foram testadas para BVD e, todas tiveram resultados negativos relativamente ao teste de antigénio. O problema foi que não testaram os vitelos que nasceram desses mesmos animais comprados, logo, possivelmente os animais PI seriam do grupo desses mesmos vitelos.

As vacas não foram tão afectadas pela infecção do BVD (infecção transitória) como as novilhas, devido ao facto de terem seroconvertido (seropositivas) e de terem adquirido protecção ao longo dos anos, comparativamente às novilhas que nunca estiveram em contacto com nenhum tipo de infecção.

Baseado no panorama ocorrido no ano de 2008 em Moorepark, especialmente no grupo de novilhas, calcularam-se as perdas económicas que um surto de BVD pode provocar numa exploração com 100 animais nunca antes expostos a infecção (animais “naive”) (Tabela 7). Um dos valores estimados teve em conta a mortalidade e morbilidade dos vitelos e os animais PI refugados e chegou-se a um valor de aproximadamente 9000 euros.

Apesar de não se ter conseguido calcular com exactidão a contribuição do BVD relativamente à baixa fertilidade registada no grupo de novilhas, devido à falta de conhecimento do estado sanitário do BVD nos anos anteriores, estimou-se que esta performance reprodutiva num grupo de 100 animais resultaria em perdas na ordem dos 19500 euros.

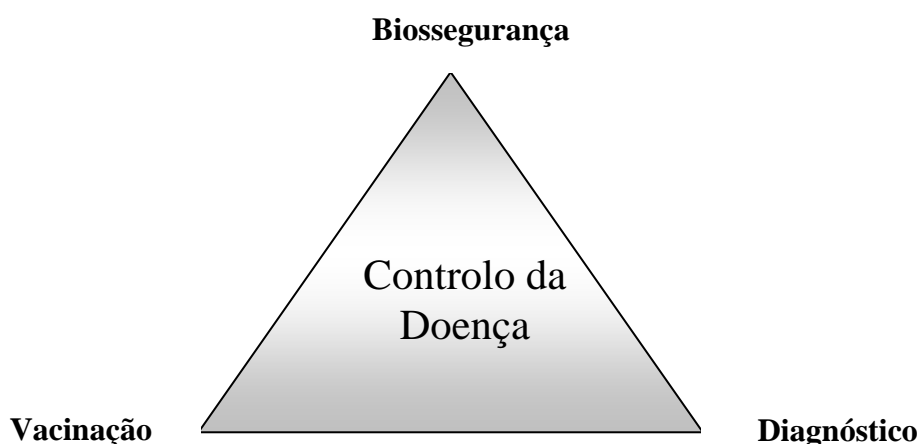
**Tabela 7.** Valores estimados num grupo de 100 animais, após um surto de BVD

<i>Efeito de infecção por BVD</i>	Valor estimado num grupo de 100 animais
PI refugados	€8,995
Baixa saúde dos vitelos	
Baixa Fertilidade	€19,500
<b>Total</b>	<b>€28,495</b>

Após estimados os valores acima referidos, chegou-se a um total de 28496 euros, como sendo um valor, subestimado, relativamente às perdas económicas que uma exploração com 100 animais pode sofrer após um surto de BVD.

Com todas estas perdas económicas é necessário intervir com um programa de controlo e Biossegurança, de modo a apostar na prevenção de BVD e de qualquer outra doença que possa afectar uma exploração.

Para isso, é necessário ter em atenção os três componentes que fazem parte de um plano de sanidade animal (Figura 4).



**Figura 4:** Componentes de um programa de controlo de doença infecciosa

Biossegurança é dos componentes que contribui mais para a prevenção de doenças infecciosas e diminuição das perdas económicas numa exploração.

A melhor política que todos os produtores devem adoptar é terem uma exploração fechada, ou seja, sem movimento de animais a entrar na exploração, incluindo touros de cobrição. As fronteiras da exploração devem estar bem demarcadas, sendo necessário um mínimo de três metros de distância da exploração vizinha, de modo a impedir o contacto directo com outros animais vizinhos.

Para que um programa de controlo funcione, antes de mais, é necessário saber o estado sanitário da exploração e de seguida implementar medidas de biossegurança e um programa de vacinação.

#### **- Determinar estado sanitário de uma exploração**

Uma das hipóteses é submeter uma amostra individual de leite ao laboratório, de modo a testar a presença de anticorpos para BVD, se se suspeitar de um animal em particular.

Pode-se também submeter uma amostra de leite do tanque de refrigeração, acompanhado de amostras de sangue de uma selecção de animais de nove meses de idade, que não estejam vacinados, para teste de anticorpos. O facto de se optar por animais com esta idade está relacionado com a não interferência de anticorpos maternos no teste. Este resultado vai determinar se BVDV está a circular na exploração no ano corrente. Se for este o caso, é esperado um nível médio a elevado de anticorpos no tanque de refrigeração e em quase todos os animais de nove meses de idade. Um mínimo de cinco animais deve ser testado, ou mais, dependendo do tamanho da exploração. Este método tem em conta os gastos económicos que o produtor tem ao proceder ao teste de BVD, visto ser uma medida que se pode tomar para se certificar de que BVD existe na sua exploração. Se BVDV estiver presente na exploração, deve-se seguir para um teste a todos os animais existentes nesta, de modo a encontrar a fonte de infecção (normalmente um animal PI). Os animais que estão em lactação podem ser testados recorrendo ao leite do tanque de refrigeração (máximo cem animais) para detecção de antigénio ou, se possível, testá-los recorrendo a amostras de sangue. Todos os outros animais devem ser testados, recorrendo a amostras de sangue, incluindo vacas que não estejam em lactação e não esquecendo os vitelos que nascerão subsequentemente ao teste.

Se um animal PI for encontrado, este deve ser removido imediatamente da exploração e enviado para o matadouro.

As amostras podem ser enviadas a um Laboratório Veterinário Regional, Laboratório Veterinário Central ou a Laboratórios Privados. Com a introdução de novos testes comerciais, é agora possível fazer um teste de BVD a todos os animais da exploração de maneira mais económica, recorrendo a amostras de leite do tanque de refrigeração e a pools de amostras de sangue.

Neste momento, os laboratórios oferecem um serviço aos produtores de pools de dez e, se o resultado for positivo, conseguem testar a amostra dos dez animais, de modo a encontrar o animal positivo ao antigénio. Sendo assim, as amostras enviadas para o laboratório, ficam a 1/ 10 do preço original, ficando mais em conta para o produtor.

### **- Implementar um plano de Biossegurança**

Quando o BVD consegue ser erradicado de uma exploração, o passo a seguir é implementar medidas de biossegurança, que impeça a doença infecciosa de entrar novamente na exploração. A primeira medida a tomar é conseguir ter uma exploração fechada. Caso isso não seja possível, sempre que se compre animais, deve-se recorrer a testes de diagnóstico e quarentena dos novos animais. A quarentena deve ser de trinta dias e se possível num paddock isolado. Se não for possível, os animais em quarentena devem estar a pelo menos três metros de distância dos outros animais da exploração, evitando desta maneira o contacto directo entre eles. Deve-se ter em atenção a fonte de alimento e água, em que não deve ser partilhada com os restantes animais da exploração.

O produtor ao comprar animais, deve então ter em atenção diversos pontos:

- Comprar, se possível, animais que tenham a mesma origem
- Falar com o vendedor sobre a história do estatuto sanitário da sua exploração e dos animais que deseja comprar
- Contrato de compra e venda que permita a devolução dos animais ao vendedor, no caso de ser detectado alguma doença no período de quarentena
- Limpar e desinfetar os estábulos antes da introdução dos novos animais na exploração
- Quarentena
- Vacinação / Teste dos animais para Salmonelose e Leptospirose
- Touros de cobrição devem ser sempre testados para BVD e IBR
- Relembrar que ao comprar animais gestantes, o produtor está a comprar dois animais, logo, deve sempre testar o vitelo para BVD ao nascer

- Discutir a melhor estratégia de diagnóstico com o seu Médico Veterinário
- Discutir a melhor estratégia de vacinação para a sua exploração com o seu Médico Veterinário

A transmissão da doença também pode ser feita através de contacto indirecto, isto é, através de vectores, tais como visitantes e veículos. De modo a diminuir o risco de doença devem ser implementadas as seguintes medidas numa exploração:

- Pedilúvios
- Utilização de sinalização de modo a alertar as pessoas para o cumprimento das medidas
- Equipamento veterinário, tal como arganel, deve estar disponível em cada exploração, de modo a evitar contacto entre animais de diferentes explorações
- Agulhas devem ser descartáveis após o seu uso em cada animal
- Luvas de palpação rectal para cada animal
- Importação de colostro deve ser evitada
- Importação de estrume para uso fertilizante deve ser evitada
- Veículos que visitem a exploração devem ficar a uma distância segura das áreas onde se encontrem os animais.

#### **- Vacinação**

As vacinas têm um papel muito importante no controlo de muitas doenças infecciosas. O seu uso, no entanto, não é garantia na prevenção de infecção por BVD, devendo ser consideradas como uma componente de um programa de controlo. Como foi possível observar no caso estudo deste projecto, o grupo de vacas mesmo estando vacinadas, foi infectado estando na presença de animais PI.

O protocolo vacinal deve ser concluído até um período fixo, específico para cada produto comercial, antes da época reprodutiva. Deve-se ter em atenção a vacinação dos animais para diferentes patologias, em que deve ser cumprido um intervalo de 14 dias entre as diferentes vacinas.

Após este caso estudo, já no final do estágio, começou-se a implementar um novo método para colheita de amostras para teste de BVD. Devido ao elevado número de vitelos que iriam nascer em todas as explorações de Moorepark em 2009 (mais de 1000 animais),



colher amostras de sangue de todos eles seria muito mais demorado, por isso, decidiu-se recorrer à biopsia de pele (orelha). Este método consiste em colocar um brinco no animal, como o brinco de identificação, mas contendo uma parte que retira uma amostra de tecido da orelha, sendo a amostra enviada para o laboratório (Figura 4). Este brinco ficará com o animal para o resto da vida. O teste de diagnóstico para BVD que está a ser utilizado nestas amostras é de PCR. Este método está a ser utilizado somente nas explorações pertencentes a Moorepark, tendo a autorização do Departamento de Agricultura e Pescas Irlandês, de modo a obter a validação do método e poder ser estendido ao resto das explorações do país.



**Figura 4:** Brinco de identificação com amostra de tecido de orelha

## Conclusão

Sendo a diarreia viral bovina uma das doenças infecciosas com maior incidência nas explorações de hoje, torna-se essencial a implementação de um programa de controlo ou mesmo uma campanha de erradicação.

A vacinação não é garantia para a prevenção de BVD. A única maneira de se conseguir implementar um programa de controlo e torná-lo eficaz é através da combinação de três passos: Diagnóstico, Biossegurança e Vacinação.

Os últimos acontecimentos em Moorepark, indicam que a eficiência de um programa de vacinação pode ser posto em causa, se os animais PI não forem imediatamente removidos da exploração, mal estes sejam identificados.

Nunca utilizar a vacinação como um método de substituição de Biossegurança, bom maneio dos animais e contínua monitorização do estatuto sanitário da exploração.

A exposição de BVDV num grupo de animais nunca antes expostos a infecção, pode resultar num maior aumento de animais PI, o que leva à continuação da propagação do vírus nas explorações, como se pode constatar no caso estudo abordado neste relatório.

Com todas estas medidas, pretende-se implementar na Irlanda um certificado para cada exploração, que possa permitir aos produtores e indústria a compra de animais de conhecido e provado estatuto sanitário.

## **Lista de abreviaturas**

BVD - Diarreia viral bovina

BVDV - Vírus diarreia viral bovina

PI - Persistentemente infectado

TI – Transitoriamente infectado

PCR- Polymerase Chain Reaction

RT-PCR- Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

IHC- Imunohistoquímica

AC-ELISA – Antigen Capture- Enzyme Linked Immunosorbent Assay

## **Bibliografia**

Anderson, M., 2007. “Infectious causes of bovine abortion during mid- to late gestation”. **Theriogenology** 68: 474- 486.

Anónimo (2000)

BonDurant, R.H. 2007. “Selected diseases and conditions associated with bovine conceptus loss in the first trimester”. **Theriogenology** 68: 461-473.

Brownlie, J. (2002). “Bovine virus diarrhoea virus: pathogenesis and control”. In: **Recent Developments and Perspectives in Bovine Medicine, Keynote lectures of the XXII World Buiatrics Congress**. 24-30.

Fray, M.D., Paton, D.J., Alenius, S. (2000). "The effects of bovine viral diarrhoea virus on cattle reproduction in relation to disease control". **Animal Reproduction Science** 60–61: 615–627.

Greiser-Wilke, I., Grummer, B., Moening, V., (2003). "Bovine diarrhoea eradication and control programmes in Europe". **Biologicals** 31: 113-118.

Gunn, G.J., 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**.

Houe, H., 1999. "Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections". **Veterinary Microbiology** 64: 89-107.

<http://www.enfergroup.com>

<http://www.teagasc.ie>

Larson, R.L., Brodersen, B.W., Grotelueschen, D.M., Hunsaker, B.D., Burdett, W., Brock, K.V., Fulton, R.W., Goehl, D.R., Sprowls, R.W., Kennedy, J.A., Loneragan, G.H., Dargatz, D.A., (2005). "Considerations for Bovine Viral Diarrhea (BVD) Testing". **Bovine Practice** 39 (2): 96-100.

Laven, R. (2008). "Diagnosis of Bovine viral diarrhoea virus (BVDV)- associated problems". **UK Vet-** 13 no 3

Lindberg, A., Houe, H. (2005). "Characteristics in the epidemiology of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) of relevance to control" **Preventive Veterinary Medicine** 72 : 55–73.

Mee, J.F., Fahey, J. & Crilly, J. (1999). "Breeding the Dairy Cow of the Future - Today's Challenges". **Proceedings of the National Dairy Conference**.  
<http://www.teagasc.ie/publications/ndc1999/index.asp>

Moenning, V., Houe, H., Lindberg, A. (2006). “BVD Control- State Of The Art”. In: **World Buiatrics Congress – Nice, França.**

Niskanen, R., Lindberg, A., (2003). “Transmission of Bovine Viral Diarrhoea Virus by Unhygienic Vaccination Procedures, Ambient Air, and from Contaminated Pens”. **The Veterinary Journal** 165: 125-130.

Radostis, O., Littlejohns, I. 1988. “New concepts in the Pathogenesis, Diagnosis an Control of Diseases caused by the Bovine Viral Diarrhoea Virus”. **Canadian Veterinary Journal** 29: 513-528.

Sayers, R. (2008) “BVD – What it is and how to control it?” In: **The Farmers journal.**

Sayers, R. (2008) “Control of Infectious Diseases in Irish Dairy Herds”. In: **Proceedings of the National Dairy Conference.**

Thobokwe,G., Heuer, C., Hayes, DP., (2004). “Validation of a bulk milk tank antibody ELISA to detect dairy herds likely infected with bovine viral diarrhoea virus in New Zealand”. **New Zealand Veterinary Journal** 52(6): 394-400.

Valle, P.S., Martin, S.W., Tremblay, R., Bateman, K.,(1999). “Factors associated with a bovine-virus diarrhoea (BVD) seropositive dairy herd in the More and Romsdal Country of Norway”. **Preventive Veterinary Medicine** 40:165-177.

Zimmer, G.M., Van Maanen, C., De Goey, I., Brinkhof, J., Wentink, G.H., (2004). “The effect of maternal antibodies on the detection of bovine virus diarrhoea virus in peripheral blood samples”. **Veterinary Microbiology** 100: 145-149.

Quinn, P.J., Markey, B.K., Donnelly, W.J., Leonard, F.C. (2004). “Flaviviridae”.**Veterinary Microbiology and Microbial Disease.** 3° Ed., Blackwell Publishing, 426-433.