

JOÃO PAULO VALADÃO CORVELO

**PREVALÊNCIA DO VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA (BVDV)
EM VACAS LEITEIRAS
NAS ILHAS DAS FLORES E DO CORVO (AÇORES)**

Orientador: Professor Doutor João Ribeiro Lima

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

**Lisboa
2016**

JOÃO PAULO VALADÃO CORVELO

**PREVALÊNCIA DO VIRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA (BVDV)
EM VACAS LEITEIRAS
NAS ILHAS DAS FLORES E DO CORVO (AÇORES)**

Dissertação defendida em provas públicas para a obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária no curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias no dia 14 de Setembro de 2017, perante o Júri nomeado pelo Despacho de Nomeação nº 277/2017 de 8 de Setembro de 2017, com a seguinte composição:

Presidente: Professora Doutora Laurentina Pedroso

Arguente: Professor Doutor João Cannas da Silva

Orientador: Professor Doutor João Ribeiro Lima

Vogal: Professora Doutora Margarida Alves

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

**Lisboa
2016**

"A persistência é o caminho do êxito"

Charles Chaplin

Agradecimentos

Embora uma tese seja, pela sua finalidade académica, um trabalho individual, há contributos que devem ser realçados e por essa razão desejo expressar os meus sinceros agradecimentos:

- Ao meu orientador, Professor Doutor João Ribeiro Lima, por ter aceite embarcar neste trabalho na minha terra natal, pela 'liberdade de ação', pela competência científica, pelas críticas, correções e sugestões feitas.

- Ao meu coorientador, Doutor Carlos Pinto (Serviço de Desenvolvimento Agrário de S. Miguel, Açores) pela atenção e dispor que sempre demonstrou, pelo incentivo que me transmitiu, dando-me a oportunidade de desenvolver este trabalho.

- Ao Dr. Pedro Lima por todos os conhecimentos transmitidos nas atividades desenvolvidas nas vacarias e no trabalho de campo, bem como pela amizade que sempre demonstrou ao longo do meu percurso académico.

- À Eng^a Sandra Benevides (Laboratório Regional de Veterinária dos Açores) pela disponibilidade e apoio na análise das amostras de sangue utilizadas neste estudo e pela amizade demonstrada.

- Ao Secretário Regional da Agricultura e Pescas dos Açores, Eng.º Luís Nuno Ponte Neto de Viveiros pela disponibilidade de poder estagiar nos Serviços de Desenvolvimento Agrário das Flores e Corvo.

- Ao Diretor de Serviços de Veterinária dos Açores, Dr. Hernâni César Dantas Martins que desde o princípio me acolheu e me incentivou na realização deste trabalho.

- Ao Serviço de Desenvolvimento Agrário das Flores e Corvo, por me ter proporcionado as condições necessárias para a elaboração da minha tese e por permitir a minha integração neste grupo de trabalho, em especial ao Dr. Dércio Silveira com o qual tive o privilégio de colaborar, à Eng^a Alice Rocha pelo apoio prestado, esclarecimentos e disponibilização de informação e à Dr.^a Cátia Lourenço pelo apoio que me proporcionou no Matadouro das Flores.

- Ao Matadouro da Ilha das Flores e seus colaboradores, por me terem proporcionado a aprendizagem de outras atividades fora do âmbito desta tese.

- Aos Produtores de Leite da Ilha das Flores e do Corvo pela disponibilidade e colaboração prestada ao longo da realização deste trabalho.

- Aos elementos da Brigada Sanitária dos Serviços de Desenvolvimento Agrário das Flores e Corvo pela ajuda prestada no trabalho de campo, pelo imprescindível apoio na colheita das amostras de sangue, bem como na realização dos inquéritos efetuados nas explorações leiteiras.

- Ao Eng.º Hernâni Borges pelo incentivo desde o início do meu percurso académico, pela amizade e pela colaboração que me deu desde sempre.

- Aos meus grandes amigos e colegas de curso: Ana Beatriz Damião Soares, Ana Sofia Filipe, Carolina Guerreiro, João Afonso Subtil, João Costa e Palma, João Moreira, José Feio, Miguel Santos, Pedro Vasconcelos, Ricardo Caselhas e Vasco Franco. Um Muito Obrigado pela vossa amizade, companheirismo e por me aturarem durante estes anos todos.

- À minha família pelo apoio incondicional ao longo destes anos. Em especial ao meu pai por me ajudar a ser quem sou, por depositar confiança naquilo que faço e por tudo o que fez por mim. Ao meu tio, Dr. Paulo Valadão, médico veterinário, por estar sempre presente, pelo apoio incondicional, pela transmissão de conhecimentos e vivências e por ser responsável por mais esta etapa da minha vida. À minha prima ‘caçula’, Emília Isabel Valadão, finalista do mestrado em engenharia química, pelo apoio, carinho, amizade e presença desde sempre. À minha irmã, pela amizade, carinho, compreensão e por estar sempre a ‘torcer’ por mim. E finalmente à minha mãe (*in memoriam*), obrigado por teres cuidado de mim, por teres escutado sem julgar, por nunca teres desviado o teu olhar sempre protetor e por teres sido a pessoa que sempre desejou este meu sucesso.

- À minha filha, minha luz...espero ser capaz de te indicar os caminhos certos e felizes...

A todos, o meu muito Obrigado!

Resumo

As ilhas das Flores e do Corvo pertencem ao grupo ocidental do arquipélago dos Açores. Existem cerca de 7700 bovinos distribuídos por 372 explorações, das quais, 30 são explorações leiteiras. Neste levantamento, todos os bovinos das explorações leiteiras foram testados para a presença de anticorpos contra a Doença Viral Bovina (BVD) e para a presença de vírus da Doença Viral Bovina (BVDV). O rastreio foi realizado com amostras individuais de soro utilizando o ensaio de imunoabsorção enzimática, teste de anticorpos ELISA (*kit* comercial ‘IDEXX BVDV total AbTest’) e misturas de amostras de soro utilizando a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (RT-PCR) (*kit* comercial ‘MagVet™ Universal’ e ‘LSI VetMAX™ BVDV Screening Real-Time PCR Kit, synthetic EPC’). Para os animais com idade igual ou inferior a 6 meses, foi feita a colheita de sangue para tubos com anticoagulante (EDTA) para pesquisa de antígeno anti-BVDV.

A seroprevalência e prevalência de BVDV foi determinada em 30 explorações leiteiras, testando 277 bovinos de Ilha das Flores e 17 de Ilha do Corvo, de setembro de 2015 a janeiro de 2016. Todos os rebanhos leiteiros estavam sob as campanhas oficiais de saneamento, muito deles apresentando problemas de fertilidade.

Não foram identificados animais PI. A prevalência de BVDV ao nível das explorações foi de 100% na ilha do Corvo e 83,3% na ilha das Flores. A seroprevalência de BVDV nos animais foi 36,8% e 83,3% na ilha das Flores e do Corvo, respetivamente

Este estudo é mais um passo para controlar e erradicar a BVDV nos bovinos leiteiros nestas duas ilhas. Dada a alta taxa de animais afetados por BVDV, é essencial tomar medidas nas explorações, fazer um levantamento epidemiológico para descobrir a causa desta seroprevalência, abatendo os animais PI (quando presentes) e implementando medidas para impedir a disseminação do vírus na população de bovinos.

Palavras-Chave: diarreia viral bovina (BVD), BVDV, prevalência, Flores, Corvo (Açores).

Abstract

Flores and Corvo islands belong to western group of the Azores archipelago. There are about 7700 bovines distributed by 372 herds from which 30 are dairy herds. In this survey, all cattle from dairy herds were tested for the presence of antibodies against Viral Bovine Disease BVD and for the presence of the Viral Bovine Disease virus (BVDV). The screening was performed with individual serum samples using the enzyme linked immunosorbent assay ELISA antibody test (commercial *kit* 'IDEXX BVDV total AbTest') and pools of serum samples using Real Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) (commercial *kit* 'MagVet™ Universal' and 'LSI VetMAX™ BVDV Screening Real-Time PCR Kit, synthetic EPC'). For animals aged less than 6 months, blood collection was performed with tubes with anticoagulant (EDTA) to investigate the presence of anti-BVDV antigene.

Seroprevalence and prevalence of BVDV was determined in 30 dairy herds, testing 277 cattle from Flores Island and 17 from Corvo Island, from September 2015 to January 2016. All the dairy herds were under oficial disease control programs and most of them presented fertility problems.

Persistently infected animals were not identified. The seroprevalence of BVDV between herds was 100% in Corvo Island and 83,3% in Flores Island. The seroprevalence of BVDV between animals was 36,8% and 83.3% in Flores and Corvo Islands, respectively.

This study is another step to control and eradicate the BVDV in cattle in these two islands. Given the high rate of affected animals by BVDV, it is essential to take measures in herds, do an epidemiological survey to find the cause of this high seroprevalence, removing the PI animals (when present) and implementing measures to prevent the dissemination of the virus in cattle population.

Keywords: bovine viral diarrhea (BVD), BVDV, prevalence, Flores, Corvo, (Azores).

Abreviaturas, siglas e símbolos

AC – Anticorpos

ADN – Ácido desoxirribonucleico

AEI – Acetiletilamina

AG – Antígeno

ARN – Ácido ribonucleico

BVD – Diarreia Viral Bovina (do inglês *Bovine Viral Diarrhea*)

BVDV – Vírus da Diarreia Viral Bovina (do inglês *Bovine Viral Diarrhea Virus*)

BVD-MD – Diarreia Viral Bovina - Doença das Mucosas

cp – Citopatogénico

DM – Doença das Mucosas

DRDA – Direção Regional de Desenvolvimento Agrário

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês *Ethylenediamine tetraacetic acid*)

e.g. - *exempli gratia* (por exemplo)

ELISA – Ensaio imunoenzimático (do inglês *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*)

IC – Intervalo de Confiança

IAMA – Instituto de Alimentação e Mercados Agrícolas

LRV – Laboratório Regional de Veterinária

ncp – Não citopatogénico

NK – Linfócitos exterminadores naturais (do inglês *Natural Killer*)

OIE – Organização Mundial de Saúde Animal (anteriormente designada por Organização Internacional de Epizootias)

ORF – Fase de leitura aberta (do inglês *Open reading frame*)

PCR – Reação em cadeia da polimerase (do inglês *Polymerase Chain Reaction*)

PI – Persistentemente infetado

R.A.A. – Região Autónoma dos Açores

Rpm – Rotações por minuto

RT-PCR – Reação em cadeia da polimerase em tempo real (do inglês *Real Time - Polymerase chain reaction*).

SDAFC – Serviço de Desenvolvimento Agrário das Flores e Corvo

SNC – Sistema Nervoso Central

SRB – Síndrome Respiratório Bovino

TA – Testagem e Abate

UTR – Regiões não traduzidas ou regiões não codantes de uma molécula de ARN (do inglês *Untranslated Regions*)

VHB-I – Vírus Hepatite B-I

VD – Diarreia viral (do inglês *Viral Diarrhea*)

% – Percentagem

® – Marca Registrada

™ – Marca registrada ou marca de fábrica (do inglês *Trade Mark*).

Índice geral

Agradecimentos.....	i
Resumo.....	iii
Abstract.....	iv
Abreviaturas, siglas e símbolos.....	v
Introdução.....	1
Capítulo I - Relatório de Estágio.....	4
Capítulo II – Enquadramento Teórico-Conceptual.....	8
1 – Diarreia viral bovina.....	9
1.1 – História.....	9
1.2 – Vírus.....	11
1.3 – Epidemiologia.....	13
1.3.1 – Prevalência.....	15
1.3.2 – Transmissão.....	18
1.3.3 – Imunologia.....	20
1.3.4 – Patogenia.....	21
1.3.4.1) Infecção pré – natal.....	23
• Infecção anterior à concepção.....	23
• Infecção venérea.....	25
• Infecção durante o período embrionário: 0-45 dias de gestação.....	26
• Infecção após o período embrionário: 45 -125 dias de gestação.....	27
• Infecção durante o período fetal: 125-150 dias de gestação.....	29
• Infecção dos 150 dias até ao final da gestação.....	30
1.3.4.2) Infecção pós – natal.....	31
1.4 – Sinais clínicos.....	32
1.5 – Diagnóstico.....	35

1.5.1- Diagnóstico diferencial	39
1.6 – Prognóstico e tratamento.....	40
1.7 – Controlo do BVDV	41
1.7.1 – Medidas de biossegurança e biocontrolo.....	43
1.7.2 – Eliminação de animais PI.....	44
1.7.3 – Vacinação	45
3 - Material e métodos	50
3.1 – Caracterização das explorações leiteiras	50
3.2 – Recolha de dados e caracterização da amostra.....	50
3.3 – Sorologia	51
3.4 – Questionário epidemiológico	52
3.5 – Análise dos dados.....	52
4 – Resultados.....	55
4.1 – Colheita das amostras.....	55
4.2 – Prevalência de explorações com níveis de anticorpos positivos do BVDV.....	56
4.3 – Prevalência de explorações infetadas com BVDV.....	57
4.4 – Questionário epidemiológico	58
4.4.1 – Estrutura da exploração	58
4.4.2 – Contacto entre explorações e vulnerabilidade a vetores	58
4.4.3 – Maneio dos vitelos e novilhos	60
4.4.4 – Práticas vacinais	61
4.4.5 – Principais problemas sanitários nas explorações.....	61
5 – Discussão	62
6 – Conclusões	70
Bibliografia.....	72
Anexos.....	106

Índice de figuras

Figura 1: Ciclo de replicação viral dos pestivírus: 1) adsorção; 2) endocitose; 3) fusão com lisossomas; 4) descapsidação; 5 e 6) tradução; 7) formação da poliproteína viral; 8) replicação; 9) encapsidação; 10 e 11) organização; 12) libertação dos viriões (Adapatado de Leyssen, De Clercq & Neyts, 2000)	23
--	----

Índice de gráficos

Gráfico 1: Percentagem de explorações em que houve contacto com outros animais – ovelhas, cabras, porcos e cães.....	59
Gráfico 2: Distribuição percentual dos principais problemas sanitários relatados pelos produtores nas explorações estudadas.....	61

Índice de tabelas

Tabela 1: Relação entre os diferentes motivos e testes de diagnóstico (adaptado de Laven, 2008).....	36
Tabela 2: Diferenciação clínica do aborto causado pela BVD (adaptado de Radostitis <i>et al.</i> , 2002)	40
Tabela 3: Comparação entre vacinas vivas modificadas e vacinas inativadas	48
Tabela 4: Vacinas utilizadas em Portugal contra o BVDV.....	49
Tabela 5: Número de animais e número de explorações existentes por freguesia na ilha das Flores e ilha do Corvo.....	55
Tabela 6: Prevalência da infeção e percentagem de animais positivos na ilha das Flores e Corvo (\bar{x} = média percentual; IC 95% = intervalo de confiança de 95% para a média percentual) e prevalência global para o grupo ocidental do arquipélago dos Açores.....	56
Tabela 7: Distribuição dos resultados do teste ELISA-ac pela idade média dos bovinos analisados (em meses e anos)	57
Tabela 8: Caracterização do efetivo presente nas explorações leiteiras, no conjunto da ilha das Flores e do Corvo, aquando do questionário epidemiológico.....	58

Introdução

A diarreia viral bovina (também conhecida pelos acrónimos DVB e BVD) é uma doença infecciosa causada pelo vírus da diarreia viral bovina (*Bovine viral diarrhea virus* - BVDV), pertencente à família *Flaviviridae*, membro do género *Pestivirus* (Valle *et al.* 1999; ICTV, 2015).

O BVDV é um importante agente infeccioso de bovinos, responsável por perdas económicas significativas nas explorações leiteiras e de carne em todo o mundo (Flores *et al.*, 2005; Heuer *et al.*, 2007; Houe, 2003). De acordo com Rocha (2009) “*as perdas económicas causadas por BVD são consideráveis apesar da extensão destas ser difícil de calcular porque temos que supor que um número de infeções de BVD remanescem sem serem diagnosticadas ou as perdas associadas àquelas infeções não estão reconhecidas como sendo causadas pelo vírus.*” (Rocha, 2009; p.2). Estas perdas podem depender de vários fatores diferentes tais como da estrutura da exploração, da percentagem de animais suscetíveis (seronegativos), do risco de exposição, do valor da perda causado pela infeção num animal suscetível ou do custo de cada categoria de perda (Wolf, 1997). O problema assenta sobretudo nas perdas causadas pela redução da fertilidade e da produção de leite; as perdas podem ser produtivas (indução de imunossupressão) e reprodutivas (morte embrionária, abortos e estádios tardios de gestação).

O BVDV apresenta uma enorme variabilidade genética e antigénica. Sendo um vírus de ARN, a sua capacidade de mutação e recombinação confere-lhe tanto a capacidade de causar infeções subclínicas (com indução de imunossupressão), como de desencadear doença hiperaguda e fatal, frequentemente em sinergia com outros agentes.

Apresenta dois biótipos designados por não-citopático (BVDV-ncp) e citopático (BVDV-cp), dependendo do efeito que tem em tecidos celulares, em que o tipo ncp é o mais comum e mais importante, visto ser o que atravessa a placenta e infeta o feto (Brownlie *et al.*, 1987). São considerados dois genótipos, o BVDV-1 (forma mais isolada) e BVDV-2 (forma mais atípica), sendo o BVDV-1 o genótipo utilizado em vacinas e testes de diagnóstico (Quinn *et al.* 2004; Kuta *et al.*, 2015).

Os sinais clínicos de infeção por BVDV são muito variáveis, incluem desde poucos ou nenhuns sinais até sinais muito graves que levam à morte do animal. Esses sinais tendem a ser determinados pelo genótipo do vírus, se a infeção é aguda ou crónica, se a fêmea está gestante bem como outros fatores. Alguns dos sinais de infeção aguda são: febre, letargia,

diarreia, leucopenia, perda de apetite, corrimento nasal, descarga ocular, lesões orais, diminuição da produção de leite (Radostits & Littlejohns, 1988). A infecção crónica pode levar a sinais de doença da mucosa (DM).

Um dos principais problemas que tem afetado as explorações pecuárias das ilhas das Flores e do Corvo é sem dúvida a existência de doenças do foro reprodutivo, as quais têm causado problemas como morte embrionária, aborto, nascimento de vitelos mortos, nascimento de vitelos debilitados que morrem nas primeiras semanas de vida e intervalo entre partos alargado. No caso das explorações leiteiras, este problema faz-se sentir também na redução do período de lactação, menor produção de vitelos por ano e durante a vida útil da vaca. Também provoca perdas económicas ao causar o aumento significativo da incidência de patologias do foro respiratório, hematológico, gastrointestinal, circulatório e imunológico. Como resultado final, verifica-se a diminuição do rendimento das explorações bem como o aumento dos custos em assistência veterinária.

O vírus da diarreia viral bovina é o agente infeccioso mais importante nas explorações leiteiras e no que respeita aos Açores, existe uma elevada prevalência do BVDV como demonstrado pelas análises realizadas pelo Laboratório Regional de Veterinária (LRV) em 2008: 57,5% de prevalência no total das nove ilhas e 84,2% de explorações positivas. Estes resultados poderão advir da inexistência de um programa de controlo e erradicação organizado, sistematizado e coordenado pelas entidades oficiais, no caso dos Açores, pela Direcção Regional da Agricultura.

Sendo a bovinicultura leiteira de extrema importância económica para o arquipélago, é imperativo a execução de um plano de vigilância e erradicação desta patologia sendo inclusive uma orientação da União Europeia que pretende erradicar esta doença do espaço comunitário, facto substanciado pela Directiva 88/407/CEE de 14 de junho de 1988, que fixa as exigências de polícia sanitária aplicáveis às trocas comerciais intra-comunitárias e às importações de sêmen de animais da espécie bovina, alterada pela Decisão de Execução da Comissão 2011/630/EU de 20 de setembro de 2011.

O objetivo geral desta dissertação foi avaliar a situação da Diarreia Viral Bovina na população bovina de aptidão leiteira nas ilhas das Flores e do Corvo. O objetivo específico foi determinar a prevalência em todas as explorações leiteiras, destas duas ilhas, com evidência de contacto com o BVDV. A realização deste estudo, que permitiu diagnosticar a situação da disseminação do vírus, envolveu avaliações sorológicas das explorações leiteiras para verificar a prevalência do vírus assim como identificar os seus fatores de risco mediante

a aplicação de um questionário epidemiológico junto dos produtores. A partir daqui, será possível estabelecer um plano de controlo eficiente e prevenir a infeção por este agente, diminuindo as perdas económicas e conduzir à sua erradicação nas explorações bovinas.

Capítulo I - Relatório de Estágio

Relatório de Estágio

O estágio curricular foi realizado no Serviço de Desenvolvimento Agrário das Flores e Corvo (SDAFC), localizado na ilha das Flores (Estrada Regional- Fazenda. 9960-220 Fazenda, Lages das Flores) durante os meses de setembro de 2015 a março de 2016.

Este estágio permitiu, através do acompanhamento dos trabalhos de índole veterinária em espécies pecuárias - maioritariamente em bovinos de aptidão leiteira - adquirir competências que possibilitam o desenvolvimento de atividades de uma forma independente aplicando todos os conhecimentos teóricos e práticos adquiridos durante o curso.

O principal objetivo do estágio foi efetuar o diagnóstico da BVD nas explorações leiteiras das ilhas das Flores e do Corvo (Açores). Nesse sentido foram adquiridas competências técnicas no procedimento de colheita e envio de amostras para testes imunológicos em bovinos, no âmbito da deteção de anticorpos do vírus BVD e do antigénio permitindo a identificação de animais persistentemente infetados (PI). Paralelamente foi feita uma análise e manejo do risco, assentando este último na identificação dos fatores de risco presentes, sob a forma de um questionário epidemiológico nas explorações leiteiras obtendo-se informação relevante de avaliação do risco de introdução, manutenção e disseminação da BVD nessas explorações.

Para além desta instituição de acolhimento, o estágio curricular também decorreu no IAMA (Instituto de Alimentação e Mercados Agrícolas) – Matadouro das Flores (Caminho dos Vales, S/N. 9970-380 Santa Cruz das Flores), em várias explorações de leite e de carne e em ações pontuais de atividade médico-veterinária um pouco por toda a ilha das Flores. No primeiro caso adquiriram-se competências no âmbito do controlo oficial, nomeadamente em termos de decisões sanitárias, controlo de higiene das instalações da unidade de abate e o cumprimento dos requisitos legais nas operações de abate. Nos restantes casos, adquiriram-se competências no âmbito do controlo oficial e fiscalização (autoridade sanitária veterinária) bem como o exercício de clínica de pequenos e grandes animais, realização de exames a animais e aconselhamento a produtores (alimentação, nutrição, reprodução, instalações de alojamento e controlo da qualidade dos produtos). Assim:

1) **Local:** Serviço de Desenvolvimento Agrário das Flores e Corvo - SDAFC

Período: setembro de 2015 a março de 2016

Responsável: Dr. Dércio Silveira (Médico Veterinário)

Objetivo: obtenção de competências no âmbito do procedimento técnico de colheita e envio de amostras para testes imunológicos para determinação da prevalência do BVDV em vacas leiteiras.

Atividades desenvolvidas: Acompanhamento das Brigadas Sanitárias do Serviço de Desenvolvimento Agrário das Flores e Corvo na colheita de amostras de sangue em todos os bovinos de todas as explorações leiteiras das Ilhas das Flores e do Corvo num total de 30 explorações (24 na Ilha das Flores e 6 na Ilha do Corvo). A seroprevalência e a prevalência de BVDV foi determinada testando 277 bovinos da ilha das Flores e 17 da Ilha do Corvo.

2) **Local:** Matadouro da ilha das Flores (IAMA)

Período: setembro de 2015 a março de 2016

Responsável: Dr.^a Cátia Lourenço (Médica Veterinária)

Atividades desenvolvidas: obtenção de competências no âmbito de Inspeção Sanitária a bovinos, ovinos, caprinos e suínos.

3) **Local:** Ilha das Flores

Período: setembro a dezembro 2015

Responsável: Dr. Dércio Silveira (médico veterinário)

Atividades desenvolvidas: clínica de pequenos animais.

4) **Local:** Ilha das Flores

Período: setembro a dezembro 2015

Responsável: Dr. Dércio Silveira (médico veterinário)

Atividades desenvolvidas: clínica de grandes animais: acompanhamento de explorações leiteiras e de carne em toda a ilha das Flores; cesarianas em vacas; necrópsias a bovinos para estudo no Laboratório Regional de Veterinária da Região Autónoma dos Açores (Direção Regional do Desenvolvimento Agrário/ Direção de Serviços de Veterinária); aconselhamento técnico.

Capítulo II – Enquadramento Teórico-Conceptual

1 – Diarreia viral bovina

1.1 – História

A BVD é uma virose que foi diagnosticada pela primeira vez nos Estados Unidos da América em 1946 a partir de um surto num rebanho de bovinos; os animais apresentavam febre, ulceração das mucosas, diarreia, tosse e hipersalivação. A doença, no entanto, caracterizava-se por uma elevada morbidade e uma baixa mortalidade (4-8%). Foi reconhecido que a doença tinha uma componente respiratória (sinais de doença respiratória), leucopenia, bem como uma diminuição na produção de leite e um aumento da taxa de aborto. A doença foi reprodutível experimentalmente, mas não foi possível isolar nenhuma bactéria daí que se tenha suscitado de uma etiologia viral e introduzido o nome de ‘diarreia viral’ (Olafson, *et al.*, 1946).

Também em 1946, no Canadá, Childs (1946) descreveu uma doença dos bovinos muito semelhante, mas mais grave e com uma elevada taxa de mortalidade, embora a morbidade (dentro da exploração) fosse baixa. Os bovinos afetados exibiam diarreia aquosa e sanguinolenta, pirexia, desidratação, tenesmo, taquipneia, taquicardia, orelhas caídas, anorexia, corrimento nasal, hipersalivação, úlceras nas narinas, focinho, lábios, mucosas e membranas da cavidade oral. O relatório original também descreveu lesões de pele sobre as regiões inguinal e perineal, face interna das coxas e dentro das orelhas.

Na década de 50, nos Estados Unidos da América, Ramsey & Chivers (1953) descreveram uma síndrome muito semelhante ao descrito por Childs e designaram-no por Doença das Mucosas (DM). Os principais sintomas desta nova doença eram hemorragias e lesões intestinais, diarreia grave, depressão, anorexia e ulceração da mucosa oral. Mas ao contrário da ‘diarreia viral’, esta não foi possível ser desencadeada experimentalmente pelo que foram consideradas doenças diferentes. Em 1957 foi possível isolar um vírus (cp) a partir de um caso de DM mas mesmo assim não foi possível reproduzir a doença experimentalmente (Underdahl, *et al.*, 1957). No mesmo ano investigadores da Universidade de Cornell (Nova Iorque, E.U.A) conseguiram isolar um vírus não citopático (ncp) de um caso de ‘diarreia viral’ sem, contudo, estabelecerem ligação entre ambas as doenças (Lee & Gillespie, 1957). Em 1960 investigadores dessa mesma universidade isolaram um vírus cp de um caso de ‘diarreia viral’ denominado na altura por *Oregon C24V*. Após a inoculação, o vírus desencadeou sintomas típicos da doença e levou à produção de anticorpos que neutralizavam

o vírus cp e ncp. Após análises efetuadas, conclui-se que os vírus da ‘diarreia viral’ e da Doença das Mucosas tinham muito em comum e ambos estavam relacionados com o vírus da Peste Suína Clássica (na época chamada de Cólera Suína) (Darbyshire, 1962).

Em 1961, o *Oregon C24V* foi modificado de forma a poder ser utilizado como a primeira vacina contra a ‘diarreia viral’. Infelizmente o uso generalizado desta vacina causou uma variedade de efeitos adversos colaterais incluindo indução da DM, insuficiência reprodutiva e defeitos congénitos (Bolin, 1995b).

Embora houvesse semelhanças na patologia da ‘diarreia viral’ e da DM, havia diferenças substanciais: a ‘diarreia viral’ bovina estava associada a surtos esporádicos, com elevada morbidade, mas baixa mortalidade, enquanto que a DM foi observada em bovinos jovens com baixa morbidade, mas mortalidade da ordem dos 100%. Quando os investigadores tentaram reproduzir a DM com isolados do vírus cp, a doença resultante assemelhava-se à ‘diarreia viral’ branda. Estas observações, bem como outras similaridades, levaram a que a DM e a ‘diarreia viral’ bovina fossem consideradas a mesma doença com pequenas variações (Jubb & Kennedy, 1963). No final da década de 60, a doença foi vulgarmente chamada de ‘BVD-DM’.

No final da década de 80, tudo o que era conhecido sobre BVDV foi revisto. Um surto hemorrágico grave em bovinos adultos e vitelos associado ao BVDV-ncp foi registado em vários países (Perdrizet *et al.*, 1987). Este surto foi caracterizado por febre, trombocitopenia, diarreia sanguinolenta, epistaxe, hemorragias petequiais e equimoses na superfície das mucosas. O surto, que se tornou conhecido como "surto de BVD hiperagudo" foi atribuído ao BVDV-ncp em vez da combinação esperada cp/ncp que provoca a DM. Este foi o ponto de partida para que se considerasse que o BVDV-ncp pode realmente causar doença grave em bovinos. Em 1993 nos Estados Unidos da América, Canadá e Inglaterra (David *et al.*, 1994; Pellerin *et al.*, 1994; Carman *et al.*, 1998) foi registado um surto com sinais clínicos semelhantes aos da DM, afetando bovinos de todas as faixas etárias; os sinais mais comuns foram diarreia e sinais de doença respiratória. Os bovinos mais velhos apresentavam lesões orais, as fêmeas infetadas abortaram e as taxas de mortalidade do rebanho rondaram em média 25% (Carman *et al.*, 1998).

Desde então, a caracterização do BVDV a um nível imunológico, molecular e genético foi impulsionada vigorosamente. Sabe-se hoje que a DM é uma manifestação clínica do BVDV e que ocorre em animais portadores especificamente imunotolerantes que são persistentemente infetados com o BVDV-ncp e que se tornam super-infetados com a estirpe

cp do vírus ou então quando ocorre uma mutação do vírus ncp em cp (Belák & Ballagi-Pordány, 1991; Hertig *et al.*, 1991; Baker & Houe, 1995). Os avanços nesta área permitiram em 1994 identificar o genótipo 2 do BVDV (Carman *et al.*, 1998; Ridpath *et al.*, 1994).

1.2 – Vírus

O vírus da diarreia viral bovina manifesta-se de várias formas clínicas: subclínica, infecções respiratórias, gastroenterites, alterações cutâneas, trombocitopenia e hemorragias, problemas reprodutivos (retorno de cio, nascimento de vitelos fracos, malformações congénitas e nado mortos) e a forma altamente fatal que ocorre principalmente em animais PI conhecida como Doença das Mucosas (DM) (Baker, 1995; Flores *et al.*, 2005).

A etiologia do vírus foi estabelecida pela primeira vez nos anos 60 do séc. XX. Até aí era taxonomicamente considerado Togavírus (família *Togaviridae*), só mais tarde, após sequenciação genómica é que foi considerado como Pestivírus, mais adequado à família *Flaviviridae*, género *Pestivirus*. Dentro deste género incluem-se também dois vírus que causam doenças de notificação obrigatória à Organização Mundial de Saúde Animal: o vírus da Peste Suína Clássica e o vírus ovino da Doença das Fronteiras (*Border Disease*) (Edwards & Paton, 1995; OIE, 2015).

Os pestivírus são vírus esféricos com um diâmetros de 40-60 nm, com uma estrutura de cápside icosaédrica (uma única proteína do capsídeo) (Lindenbach *et al.*, 2007). O genoma do BVDV consiste numa cadeia linear simples de ARN constituídos por cerca de 12.300 nucleótidos. A grelha de leitura (ORF) tem aproximadamente 3900 codões e é flanqueada pelas regiões 5'-*untranslated* (5'-UTR) e 3'-*untranslated* (3'-UTR), regiões não codificantes mas importantes para o início da transcrição e estabilidade do genoma. A ORF é traduzida numa única poliproteína que é processada tanto pelas proteases virais como pelas proteases celulares, em proteínas virais maduras, estruturais (C ou p14, E^{ms}, E1 e E2 ou gp48, gp33 e gp55) e não estruturais (N^{pro}, p7, NS2-3 ou p125, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B) (Ridpath, 2005). A proteína C, do capsídeo, intervém no empacotamento do ARN genómico e fornece suporte para a formação do envelope do virião. As três glicoproteínas, E^{ms}, E1 e E2, estão associadas ao envelope lipídico. A glicoproteína E2 apresenta os principais locais de reconhecimento para a produção de anticorpos neutralizantes contra o BVDV (Ridpath, 2005). Os segmentos do genoma viral mais utilizados na análise filogenética do BVDV são

a região 5'-UTR e a região imediatamente adjacente, que codifica a proteína não estrutural N^{pro} (a primeira a ser produzida) (Bolin & Grooms, 2004).

A grande diversidade de vírus expressa-se na forma de inúmeros genótipos, subgenótipos e, dentro destes, isolados. No caso dos pestivírus são conhecidos: vírus da Peste Suína Clássica (PSC), o BVD de tipo 1 (BVDV-1), o BVD do tipo 2 (BVDV-2), vírus da Doença da Fronteira e um genótipo representado por um único vírus denominado *Giraffe-1* (Van Metre, *et al.*, 2008). Em 2004, um pestivírus atípico foi isolado a partir de um lote de soro de vitelo contaminado, proveniente do Brasil; este vírus, chamado D32/00_HoBi, foi proposto como protótipo de uma nova espécie de pestivírus, BVDV-3 (Decaro *et al.*, 2011; Bauermann *et al.*, 2013).

Atualmente estão identificados 17 subgenótipos de tipo 1 e 4 subgenótipos do BVDV de tipo 2 (Nam *et al.*, 2015). O BVDV-1 é a forma mais isolada e o BVDV-2 a forma mais atípica, sendo que o BVDV-1 é o genótipo utilizado em vacinas e nos laboratórios como vírus de referência, por exemplo: BVDV-NADL, BVDV-Singer, BVDV-C24V e BVDV-NY 1 (Baker & Houe, 1995; Pellerin *et al.*, 1995; Quinn *et al.*, 2004; Kuta *et al.*, 2015).

Até recentemente, pouco se sabia dos genótipos de BVDV circulantes em Portugal. Em 2006, Barros *et al.*, realizaram um estudo envolvendo 34 estirpes portuguesas isoladas no campo, consistindo na amplificação por RT-PCR de um fragmento da zona 5'-UTR, seguido de clonagem e sequenciação. Daqui resultou a extrapolação duma análise filogenética que revelou que a maioria dos vírus, com origem em efetivos bovinos distribuídos por várias regiões do país, pertencia ao genótipo BVDV-1 (subgenótipos 1b, 1a, 1d e 1e); também foram identificados três vírus como sendo BVDV-2. Concluiu-se que o vírus BVDV-1b era o genótipo mais prevalente e que também existia em Portugal o genótipo BVDV-2. Mais recentemente Benevides *et al.* (2015) investigaram 84 isolados de BVDV das 9 ilhas do Arquipélago dos Açores e através da análise filogenética e da sequência de nucleótidos da região 5'-*untranslated* (5'-UTR) dos isolados investigados, foi demonstrado que o BVDV-1a, -1b e -1d são os subtipos predominantes no arquipélago; foram também identificados os subtipos -1e e -1h bem como o BVDV-2.

Enquanto que os genótipos são diferentes nos seus genomas, os biótipos podem ser identificados com base nas características fenotípicas. O BVDV também se pode dividir em dois biótipos de acordo com o efeito que provocam em cultura de células: o citopatogénico ou citopático (cp) e o não citopatogénico ou não citopático (ncp) (Lindberg, 2003; Peterhans *et al.*, 2003). O BVDV ncp é o mais frequente na natureza e é o responsável pela maioria dos

danos causados por BVD, enquanto amostras de BVD cp são isoladas exclusivamente de animais acometidos da Doença das Mucosas ou de surtos de doença pós-vacinal (OIE, 2015).

O BVDV ncp codifica uma proteína não estrutural denominada NS23; o BVDV cp codifica duas proteínas separadas NS2 e NS3. A NS3 é considerada uma proteína marcadora de BVDV cp. (Baker & Houe, 1995). Ambos os biótipos são patogênicos para os bovinos (Kovacs *et al.*, 2003; Peterhans *et al.*, 2003). O biótipo citopático (cp) induz vacuolização citoplasmática e morte celular, passados poucos dias após a infecção (efeito citopático). O biótipo não citopático (ncp) estabelece uma infecção inaparente e persistente, todavia não causa alterações morfológicas nas células (Baker & Houe, 1995; Van Metre *et al.*, 2008).

A citopatogênese ocorre como resultado de alterações genéticas (inserções, duplicações e/ou rearranjos), dentro da proteína não estrutural NS23 (Lindberg, 2003). Estas mutações estão associadas com o desenvolvimento da DM, a qual ocorre quando animais imunotolerantes persistentemente infetados com um vírus ncp são super-infetados com um cp (Belák & Ballagi-Pordány, 1991; Hertig *et al.*, 1991; Baker & Houe, 1995) ou devido a uma mutação do vírus ncp em cp (Hertig *et al.*, 1991). A DM é a infecção mais grave com 100% de mortalidade; apenas o biótipo ncp pode ser isolado a partir de animais PI, mas ambos os biótipos podem ser isolados a partir dos animais que sofrem da DM (Pellerin *et al.*, 1995).

Os BVDV-1 e BVDV-2 têm diversas características em comum; ambos podem provocar doenças sérias, a maioria (70-90%) das infecções são, no entanto, assintomáticas (isto é, as diferenças na estrutura genética não esclarecem a virulência). Ambos os genótipos ocorrem tanto como biótipo citopático como não-citopático (Ridpath & Bolin, 1995).

1.3 – Epidemiologia

O vírus da BVDV tem distribuição mundial, existindo em bovinos de aptidão leiteira e de carne. Está reportado em todos os países da Europa, com exceção dos países escandinavos onde é atualmente considerado erradicado, podendo existir, mas em níveis de prevalência muito baixos, de difícil detecção. Nos países onde está presente, a prevalência de animais seropositivos varia muito, entre os 40% e os 90%. A frequência de animais PI na população bovina dos países onde o BVDV está presente ronda os 0,5% até 2% (Houe, 1999; Niza-Ribeiro, 2008). Nos E.U.A as pesquisas indicam que a prevalência de animais PI é baixa, inferior a 1% (Wittum *et al.*, 2001; O'Connor *et al.*, 2007; Fulton *et al.*, 2009); a

prevalência de vacas leiteiras infetadas com BVDV é de 15% (Houe *et al.*, 1995) e numa pesquisa com base na deteção de BVDV através de RT-PCR em amostras de leite é de 1,7%.

O genótipo BVDV-1 é o mais frequente, sendo rastreado em mais de 90% dos casos, no entanto o BVDV-2 também já foi identificado em alguns países da Europa como é o caso da Holanda, Itália, Alemanha, Bélgica e Polónia (Houe, 1999; Giangaspero *et al.*, 2001; Astiz, 2013; Doll & Holsteg, 2013; AHVLA, 2014; Mirosław *et al.*, 2014) bem como no Reino Unido, embora em menor escala (AHVLA, 2014). Em Espanha e segundo Aduriz *et al.* (2015) o BVDV-2 só foi identificado em 2015, sendo que em Portugal já havia sido detetado em 2006 (Barros *et al.*, 2006).

Além dos bovinos, outros artiodátilos (caprinos, suínos, ruminantes selvagens) podem ser infetados. Embora estes animais não adquiram doença das mucosas podem, entre outros, sofrer da redução da fertilidade. Foi provado que é possível haver transmissão viral interespecies de ovinos para bovinos (Carlsson & Belák, 1994).

Os principais reservatórios do vírus são os bovinos PI, pois eliminam milhões de partículas virais diariamente, aumentando assim o risco de contágio e infeção dos animais que lhe estão próximos – funcionam como reservatórios e fonte permanente de vírus para toda a manada.

Para além da infeção adquirida dos bovinos PI, um bovino pode adquirir o vírus em contacto com animais com infeção aguda (IA) (Brownlie *et al.*, 1987). Os animais que contactam o vírus pela primeira vez sofrem uma infeção transitória, virémia, desenvolvem uma resposta imunitária e passam a eliminar o vírus nas suas secreções e excreções (Baker, 1987; Dubovi, 1994; Houe, 1999; Lindberg & Alenius, 1999; Lindberg, 2003). A quantidade de vírus eliminada por estes animais com infeção aguda é, no entanto, menor que a produzida pelos bovinos PI (Kirkland *et al.*, 1991).

O vírus está presente nos exsudados óculo-nasais, saliva, urina, fezes, sémen, fetos abortados, líquidos uterinos, placenta, fluído amniótico, muco vaginal e colostro (Givens *et al.*, 2003; Givens & Waldrop, 2004; Gard *et al.*, 2007; Lanyon *et al.*, 2014).

As portas de entrada do BVDV são a mucosa digestiva, nasal, ocular e genital (Andrews, 2004; Thurmond, 2005).

1.3.1 – Prevalência

A infecção pelo BVDV tem distribuição mundial, apesar de ocorrerem diferenças na prevalência entre países. Para além da América do Norte, já foi relatada em vários países como o Reino Unido, Irlanda, Noruega, Dinamarca, Suécia, Polónia, Alemanha, Áustria, Hungria, Itália, Grécia, Suíça, França, Espanha, Portugal, Brasil, Cuba, Uruguai, Chile, México, Jordânia, Nova Zelândia, Austrália entre outros, sendo considerada de natureza ubíqua (Reinhardt *et al.*, 1990; Lindberg & Alenius, 1999; Schreiber *et al.*, 1999; Valle *et al.*, 1999; Giangaspero *et al.*, 2001; Niza-Ribeiro *et al.*, 2004; Billinis *et al.*, 2005; Solis-Calderon *et al.*, 2005; Grooms *et al.*, 2006; Riviera, 2008; Ridpath *et al.*, 2010; Barrett *et al.*, 2011; Astiz, 2013; Doll & Holsteg, 2013; AHVLA, 2014; Lanyon & Reichel, 2014; Aduriz *et al.*, 2015; Szabára *et al.*, 2016). A prevalência dos anticorpos antivirais no gado bovino pode também variar entre regiões geográficas dentro do mesmo país (Khan, 2010).

Por sua vez, os fatores ambientais tais como a densidade da população, aptidão do gado (para leite ou carne), tipo de exploração e as práticas de biossegurança, influenciam a gravidade e a prevalência da doença em determinadas populações de animais (Brock, 2004).

Ribeiro & Pereira (2004) efetuaram um estudo onde quantificaram a prevalência do BVDV na população de explorações de bovinos leiteiros nos concelhos de Póvoa do Varzim e Ponte de Lima (Portugal) e chegaram à conclusão que o tamanho da população influencia a distribuição do BVDV ou seja que as explorações de maior dimensão têm maior probabilidade de serem infetados do que os animais de explorações mais pequenas; neste mesmo estudo foi possível determinar que a introdução de animais PI provenientes da União Europeia, foi responsável por 30% da prevalência. Pelo contrário, Billinis *et al.* (2005) concluíram que, após a análise de 39 explorações leiteiras, o tamanho da exploração não estava associado à prevalência de animais portadores de anticorpos ou PI's. De acordo com um estudo realizado por Houe, Kjær-Ersbøll & Lindberg (2003), o nível elevado de infecção está significativamente associado a altas densidades populacionais de gado bovino, mas não ficou provado que esse nível de infecção esteja associado ao tamanho da exploração, pois parece haver alguma confusão entre 'tamanho da exploração e 'densidade populacional'.

Numerosos são os estudos que mostram diferentes valores de prevalência (seroprevalência) e incidência de animais PI. Nas áreas onde a BVD é endémica esses valores variam principalmente entre 60-85% (prevalência) e um nível máximo de 1-2% (animais PI) (Houe, 1999).

Convém no entanto distinguir entre ‘prevalência individual ou entre animais e ‘prevalência nas explorações’: a prevalência individual é obtida pela proporção entre o número de bovinos seropositivos na exploração e o total de bovinos amostrado/estudado enquanto que a prevalência nas explorações é dada pela proporção entre o número de explorações seropositivas (considerando uma exploração seropositiva quando pelo menos se encontra um animal seropositivo nessa exploração) e o número total de explorações amostradas/estudadas.

De acordo com Bitsch & Rønsholt (1995), a Finlândia, Noruega e Dinamarca apresentavam valores percentuais para animais PI respetivamente de 1%, 9% e 39% em explorações leiteiras. Segundo O'Neill *et al.* (2009) uma baixa prevalência de bovinos PI tem sido descrita no Reino Unido (0,8%), Bélgica (0,75%), Dinamarca (1,1%-1,4%), Alemanha (0,9%), Polónia (0,9%) e Irlanda (0,6). Na Hungria, Kovágó *et al.* (2015) apontam para 70% de seropositividade para BVD de acordo com um inquérito de monitorização a nível nacional; das explorações leiteiras estudadas, 43,4% eram seropositivas; neste país Szabára *et al.* (2016) efetuaram um estudo sobre a prevalência entre 2008 e 2012 a cerca de 75% da população de gado do país e demonstraram que a prevalência do vírus nas explorações foi de 12,4% e que a prevalência individual foi de 7,2%. Na Eslovénia, de 7968 amostras individuais, 18% revelaram-se positivas na pesquisa de anticorpos para a BVD (Grom & Barlic-Maganja, 1999) e na Itália a seroprevalência individual cifrou-se em 33% (Ferrari *et al.*, 1999). Na Grécia os valores médios são de 14% (prevalência) e de 1,3% (animais PI) (Billinis *et al.*, 2005). Na Suíça, após a implementação de um programa nacional de erradicação do BVDV, foi possível reduzir a proporção de vitelos nascidos seropositivos de 1,8% para 0,2% (Presi *et al.*, 2011).

Já em países fora da União Europeia podemos encontrar valores para a prevalência na exploração de 100% (todas as explorações estudadas continham pelo menos 1 animal positivo) e prevalência individual de 81% (Chile) (Reinhardt *et al.*, 1990). Na Jordânia foram encontrados valores de prevalência individual de 31,6% e de prevalência na exploração de 80,7% (Talafha *et al.*, 2009). Num estudo conduzido nos Estados Unidos da América, foram avaliados 3157 animais em 66 explorações com aproximadamente 50% dessas explorações a possuir historial de infeção por BVDV, mostrando 1,7% de animais PI e 89% de animais seropositivos (Houe, 1995). No Brasil e de acordo com um estudo realizado por Silva (2014), no Estado de São Paulo, foram examinadas amostras séricas de 12854 fêmeas, acima de 24 meses, distribuídas em 1732 propriedades e determinadas as prevalências nas fêmeas de

47,08% e na exploração de 78,21%. De acordo ainda com a mesma autora (Silva, 2014), na Argentina, Uruguai, Venezuela, Colômbia, Peru, Chile, Equador e México, as prevalências de infecção por BVDV em bovinos variam de 6,3% a 74% entre os indivíduos e de 16 a 100% nas explorações.

Niza-Ribeiro *et al.* (2004) realizaram uma pesquisa de anticorpos em 6682 amostras de soro bovino, nos concelhos de Póvoa de Varzim e Ponte de Lima (Portugal) tendo obtido resultado positivo em 63,3% das amostras; foi feita a pesquisa de antigénio a 8549 amostras tendo sido detetado em 58 animais PI e em 4 animais com virémia transitória.

Stilwell *et al.* (2007) avaliaram a seroprevalência dos anticorpos contra o BVDV em 136 vacas, nunca vacinadas, correspondente a 25% do efetivo de oito vacadas de raça Mertolenga, Preta e Cruzada (Mertolenga x Charolesa ou Preta x Limousine) pertencentes a uma mesma exploração do Ribatejo (Portugal); foi ainda determinada a seroprevalência dos mesmos anticorpos em 73 vitelos, filhos destas vacas, no dia do desmame. Obtiveram uma percentagem bastante elevada de anticorpos (acima de 60%) nas vacas de todas as manadas e, em oposição, baixos níveis de anticorpos nos vitelos (3% a 6%).

Canário (2009) determinou a seroprevalência do BVDV em 20 explorações de bovinos de carne em regime de exploração extensiva, sem programa vacinal contra a doença, distribuídas pela região do Alentejo (Portugal), através da pesquisa de anticorpos anti-BVDV; foram detetadas 39 amostras positivas num universo de 111 animais analisados, correspondendo a uma seroprevalência de 35,1% e a seropositividade estava presente em 12 das 20 explorações analisadas (65%).

No que diz respeito à Região Autónoma dos Açores (R.A.A), os primeiros casos da doença surgiram em animais importados da Alemanha em 1986. Desde 1996 que se realizam pesquisas serológicas da doença e desde 1999 que se iniciou a identificação dos animais PI. Estudos efetuados por Pinto *et al.*, (2004), os quais se basearam na análise serológica de 1763 animais com sintomatologia reprodutiva (abortos) em 29 explorações, na ilha de São Miguel, permitiram estimar uma prevalência de explorações com níveis de anticorpos positivos de 100% e uma proporção de animais seropositivos de 60%.

Benevides (2005) avaliou os níveis de anticorpos positivos em amostras de leite e de sangue na ilha Terceira. Foram pesquisadas 799 explorações leiteiras desta ilha (74,6%) e 21178 vacas leiteiras (65,4%). Do total das explorações estudadas, verificou-se que a prevalência de explorações não vacinadas, com níveis de anticorpos positivos do BVDV em amostras de leite foi de 97,2% e a prevalência de explorações vacinadas, com níveis de

anticorpos positivos do BVDV foi de 98,7%. Relativamente às amostras de sangue, Benevides (2005) estimou que em 71,3% das explorações não vacinadas, a seroprevalência se encontrava acima dos 30%; em 26% das explorações estimou que a seroprevalência se encontrava entre 10% e 30% e apenas 2,8% das explorações a estimativa deveria ser menor do que 10%.

De acordo com a Direção Regional de Desenvolvimento Agrário – DRDA (2008), existe uma elevada prevalência de animais positivos nos Açores, demonstrada pelas análises de sangue efetuadas por esta entidade: 57,5% no total das 9 ilhas (31106 animais testados) e de 63,9% em S. Miguel (7526 animais testados). Em relação à percentagem de explorações consideradas positivas, encontraram-se 84,2% no arquipélago (1731 explorações testadas) e 97,9% em S. Miguel (141 explorações testadas).

Na ilha das Flores e do Corvo, Rocha (2009) verificou, do total de explorações estudadas (n=383), que a seroprevalência de explorações com níveis de anticorpos positivos do BVDV em amostras de soro foi de 84,4% (281 explorações positivas) para a ilha das Flores e 100% para a ilha do Corvo. Relativamente à prevalência de animais com níveis de anticorpos positivos do BVDV em amostras de soro, esta autora determinou 43,2% para a ilha das Flores e 74,6% para a ilha do Corvo. No que diz respeito à prevalência de explorações infetadas com BVDV foram analisadas amostras de sangue destas explorações, tendo obtido um valor de 0,2% (prevalência global de animais infetados com BVDV).

1.3.2 – Transmissão

Os bovinos jovens PI (com biótipo ncp) são a principal fonte de infeção para outros animais, eliminando para o ambiente grandes quantidades de vírus durante toda a vida (Deregt & Loewen, 1995; Houe, 1999; Flores, 2003; Grooms, Baker & Ames, 2006;). Para além dos animais PI, animais com infeção aguda também excretam o vírus por alguns dias (Flores *et al.*, 2005).

A transmissão de agentes infecciosos, como é o caso da BVDV, é influenciada por quatro fatores: (1) infecciosidade da estirpe viral, (2) número de contactos adequados entre animais infetados e suscetíveis por unidade de tempo, (3) duração do período infeccioso (ou a prevalência de animais infetados na exploração durante um determinado período) e (4) presença de animais suscetíveis, que não possuem anticorpos seroneutralizantes (imunidade humoral) e/ou imunidade celular necessária para prevenir a infeção (Thurmond, 2005).

A transmissão do BVDV pode ser feita de duas formas: forma vertical e forma horizontal. A transmissão vertical ocorre por infecção transplacentária do feto. Esta infecção pode, por sua vez, acontecer de dois modos: quando a mãe contacta pela primeira vez com o vírus sofrendo uma infecção transitória com virémia ou quando as vacas gestantes são bovinos PI ao BVDV (Straver *et al.*, 1983; Radostits & Littlejohns, 1988; Houe, 1992). Na transferência embrionária é possível haver transmissão do vírus para o feto se a fêmea recetora tiver infecção aguda ou for PI; ou se o soro fetal bovino usado para lavar o embrião conter BVDV (Thurmond, 2005). Pode então, ocorrer transmissão vertical da fêmea recetora para o feto, resultando em morte embrionária/fetal ou no nascimento de um vitelo PI (Xue *et al.*, 2009).

A transmissão horizontal pode ser direta ou indireta. A transmissão direta ocorre normalmente pelo contacto direto oral ou nasal de animais suscetíveis com bovinos PI, sendo este considerado o principal meio de transmissão horizontal direta (Trávén *et al.*, 1991; Houe, 1995). O BVDV também pode ser transmitido através do sémen de touros PI assim como de touros com infecções agudas (Givens & Waldrop, 2004). A taxa de infecção pode ser de 100% no caso de touros PI (Meyling & Jensen, 1988); no caso de touros com infecção aguda esses valores são mais baixos (Kirkland *et al.*, 1991). Existe inclusive uma diretiva da União Europeia (Diretiva 2003/43/CE) que prevê que, antes da utilização/expedição de sémen de bois seropositivos para BVDV, deverá ser recolhida uma amostra de cada animal e sujeita a isolamento do vírus ou a teste antigénio-Elisa para o BVDV.

Em explorações de carne, a mistura acidental de machos PI com fêmeas reprodutoras suscetíveis, durante a época de reprodução pode resultar num grande surto de DM (Radostits *et al.*, 2000). A transmissão durante a transferência de embriões é possível, no entanto pode ser evitada pela utilização de medidas higiénicas adequadas (Gard *et al.*, 2007; Meyling *et al.*, 1990).

Em explorações sem animais PI a transmissão é normalmente indireta. Este tipo de transmissão requer um vetor do vírus entre bovinos infetados e bovinos suscetíveis. O sucesso desta infecção depende da estabilidade do BVDV no exterior. Atualmente há poucos dados disponíveis, mas é provável que a infeciosidade desapareça após 3-4 semanas fora do animal (Mars *et al.*, 1999; Niskanen & Lindberg, 2003). Material contaminado como agulhas, vestuário, calçado, ou alimento e água com vírus, excreções e secreções, são os vetores mais comuns (Houe, 1995; Niskanen & Lindberg, 2003; Grooms *et al.*, 2009).

Existem também alguns estudos relativamente à transmissão de BVDV por moscas hematófagas como *Haematobia irritans*, *Stomoxys calcitrans* e *Haematopota pluvialis* (Tarry *et al.*,1991; Chamorro *et al.*, 2011).

A velocidade de transmissão do BVDV dentro das explorações depende da prevalência de animais PI, da taxa de contato entre animais e da virulência das estirpes virais (Houe, 1999; Thurmond, 2005). Esta velocidade depende da própria fonte do vírus: mais lenta no caso de se propagarem através de animais com virémia temporária; mais rápida no caso de existir um animal PI (Houe, 1995; Campbell, 2004;).

A introdução de um animal PI num rebanho pode resultar na rápida disseminação do vírus entre a maioria dos bovinos suscetíveis, em menos de 6 meses. Contrariamente, se um bovino com quadro agudo for a fonte de vírus, a disseminação do BVDV pode requerer um período maior (Grooms, Baker & Ames,2006).

A disseminação do BVDV entre explorações, na maioria das vezes, ocorre pela aquisição de novos bovinos PI ou fêmeas que estejam prenhes de fetos PI (Houe, 1999; Thurmond, 2005). Explorações que tenham adquirido animais com menos de 5 anos apresentam alto risco de possuírem animais PI. A compra de novos bovinos que estejam a incubar uma infeção aguda é uma fonte importante para a introdução do vírus no rebanho (Grooms, Baker & Ames,2006). O contacto com outros bovinos através da cerca, em pastos comunitários ou em feiras e exposições podem ser importantes vias de transmissão do vírus de rebanho para rebanho (Houe, 1999; Thurmond, 2005 Grooms, Baker & Ames,2006).

1.3.3 – Imunologia

O BVDV sobrevive na população de bovinos usando duas estratégias: uma, o vírus causa infeções agudas, mas ocorre resposta humoral e resposta imunitária, ainda que de forma lenta, induzindo à proteção contra nova reinfeção; a outra estratégia é através de infeções persistentes em que o vírus estabelece imunotolerância específica (Peterhans, Jungi & Schweizer, 2003; 2006). Além disso, o vírus tem ampla variabilidade genética, mas só o vírus ncp é que é o único que pode estabelecer infeção persistente, através de infeção em estágios iniciais do desenvolvimento fetal, a fim de persistir evidenciando a resposta imune específica (Peterhans, Jungi & Schweizer, 2003).

O sistema imunitário da vaca reage às infecções agudas com a formação de anticorpos e ativando os linfócitos T (células T, CD4+ e CD8+) que reconhecem tipos diferentes de BVDV. A presença de anticorpos neutralizantes é confirmada após as duas semanas que se seguem ao primeiro contacto com o vírus. No entanto, a cinética da resposta da linfoproliferação parece diferir entre vírus cp e ncp (Collen & Morrison, 2000). Após o contacto das células com o vírus, segue-se a produção dos interferões pelos linfócitos T. Os interferões são libertados para o líquido intersticial e sangue; são reconhecidos pelos linfócitos exterminadores naturais ou “natural-killer” (NK), pelos linfócitos CD4+ e CD8+ e pelos linfócitos B.

Os linfócitos B são os principais responsáveis pela eliminação do vírus. Quando contactam com o antígeno (AG) específico do vírus ou quando são alertados pelos interferões produzidos pelos linfócitos T, diferenciam-se em plasmócitos o que permite a síntese de anticorpos (AC) em larga escala. Os AC ligam-se ao AG agregando-os de modo a facilitar a ação das NK e de outras células imunitárias presentes no local (Murphy & Chanock, 2001). Os linfócitos CD4+ são também de extrema importância em infecções por BVDV, uma vez que conseguem detetar uma grande quantidade de proteínas específicas do BVDV e em contacto com as mesmas, conseguem aumentar rapidamente os seus níveis séricos de modo a tornar a resposta imunitária mais rápida e agressiva (Howard *et al.*, 1992; Collen & Morrison, 2000). O CD4+ ataca principalmente NS3 e E2 mas também C, E^{ms}, N^{pro} e NS23 - proteínas estruturais e não estruturais do vírus. A virémia é evidente dos 2 aos 4 dias após a exposição; tanto a resposta celular como a imunidade humoral apenas podem ser detetadas após a fase virémica.

1.3.4– Patogenia

Depois da transmissão do vírus e da infeção do hospedeiro, o primeiro sofre endocitose pelas células do órgão alvo, e no retículo endoplasmático (citoplasma) sofre replicação, onde depois é libertado por exocitose (Ridpath, 2005) (Figura 1). Este replica-se nos órgãos linfoides, incluindo células da linha de defesa, como os linfócitos B, T, monócitos, macrófagos e células dendríticas. Replica-se ainda no aparelho gastrointestinal e respiratório. Nos machos também se replica na vesícula seminal e próstata e nas fêmeas, nos ovários (Kirkland *et al.*, 1991; Shin & Acland, 2001).

Os biótipos do BVDV têm diferentes órgãos preferenciais para se replicarem; no caso do ncp, replica-se preferencialmente nos leucócitos, tecidos linfoides, cólon proximal, glândula parótida e aparelho respiratório, enquanto que o cp replica-se preferencialmente no trato gastrointestinal e ovários (Liebler-Tenorio, Ridpath & Neill, 2004; Rondón-Barragán, 2006; Noiva, 2010).

A patogenia depende de fatores interativos múltiplos, envolvendo as fases pré-natal (ou intrauterina) e pós-natal e de fatores imunológicos do hospedeiro. A probabilidade de ocorrer uma infecção na vaca ou novilha gestante e essa infecção ser transplacentária é determinada pelo estado imunitário do animal (passivo ou ativo por exposição ou vacinação), pelo tempo de gestação, pela idade fetal no momento da infecção e pelo genótipo e biótipo do vírus em questão (Moennig & Liess, 1995).

De acordo com Evermann & Ridpath (2002), experimentalmente através de estudos em fetos abortados chegou-se à conclusão que BVDV-1 está vulgarmente associado a infecções persistentes, defeitos congênitos, e ao nascimento de vitelos fracos; enquanto o BVDV-2 está associado a aborto e a morte embrionária. Não está totalmente esclarecido como ocorre este mecanismo de infecção fetal; alguns estudos sugerem que o BVDV pode atravessar a placenta causando vasculite no lado materno da placenta permitindo o acesso à circulação fetal (Fredrikse *et al.*, 1999; Grooms, 2004; Gunn, Stott & Humphry, 2004; Flores *et al.*, 2005; Kahn, 2010).

O vírus pode ser transmitido através de cobrição natural ou por inseminação artificial (Fray, Paton & Alenius, 2000; Radostits *et al.*, 2000) podendo levar a falhas na fertilização, reabsorção embrionária (com retorno ao estro em intervalos regulares ou irregulares), abortos, mumificação fetal, nados mortos, nascimento de animais fracos e inviáveis que morrem logo ou tem crescimento retardado, ou nascimento de animais PI (Radostits *et al.*, 2000; Rüfenacht *et al.*, 2001; Flores, 2003; Grooms, Baker & Ames, 2006; OIE, 2015). A inseminação de novilhas soronegativas e livres do vírus, com sémen contaminado, pode resultar em taxas de concepção deficientes inicialmente, seguida por concepção normal após seroconversão e nascimento de animais normais sem evidência de infecção com o vírus (Radostitis *et al.*, 2002).

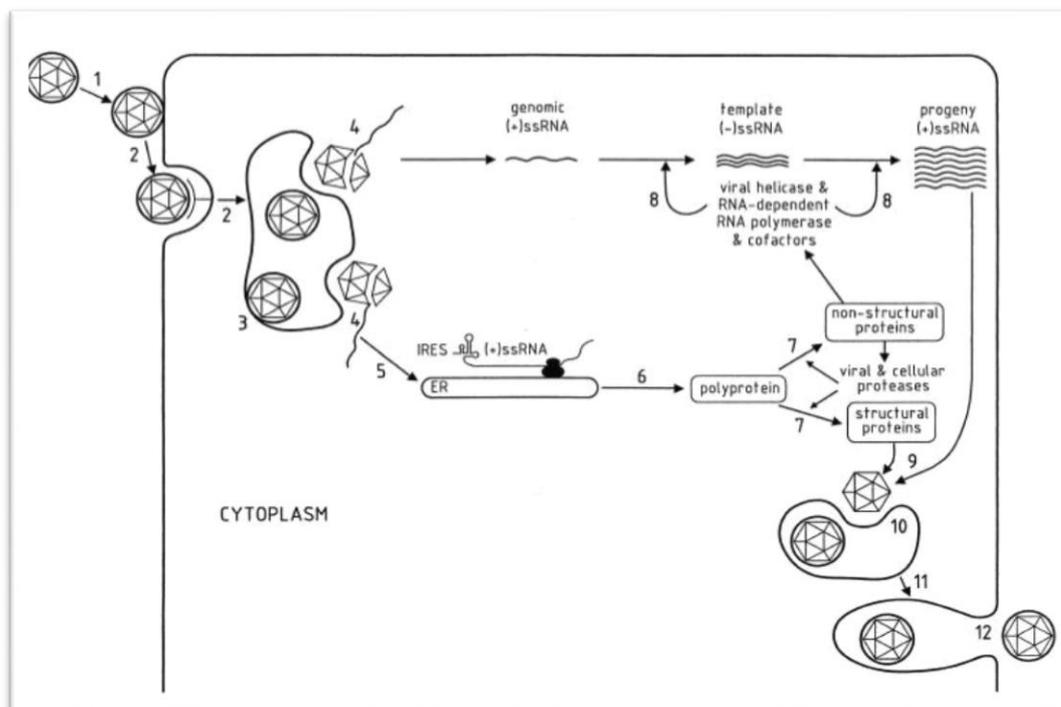


Figura 1: Ciclo de replicação viral dos pestivírus: 1) adsorção; 2) endocitose; 3) fusão com lisossomas; 4) descapsidação; 5 e 6) tradução; 7) formação da poliproteína viral; 8) replicação; 9) encapsidação; 10 e 11) organização; 12) liberação dos viriões. (Adaptado de Leyssen, De Clercq & Neyts, 2000).

As consequências da infecção fetal normalmente são observadas desde várias semanas a vários meses depois da infecção materna e são determinadas pela fase da gestação em que a fêmea é infetada, biótipo (cp/ncp) e pela estirpe do vírus (Flores *et al.*, 2005; Liebler-Tenorio, 2005).

1.3.4.1) Infecção pré-natal

- **Infecção anterior à concepção**

A exposição dos animais ao vírus durante o ciclo éstrico, antes da inseminação ou da cobertura natural, pode provocar uma diminuição da taxa de concepção, devida a ovulação tardia (infertilidade) com repetição do cio (Andrews *et al.*, 2004; Liebler-Tenorio, 2005; Kahn, 2010; OIE, 2015). No entanto, estas alterações são passageiras e o animal apresenta retorno ao ciclo éstrico (Flores *et al.*, 2005).

O BVDV também tem sido associado a ovarites em novilhas inférteis (Grooms, Baker & Ames, 2006). Vacas PI podem apresentar alterações morfológicas nos ovários, sugerindo uma redução na atividade ovárica. A disfunção ovárica é uma das vias pela qual a infecção por BVDV causa diminuição das taxas de concepção (Liebler-Tenorio, 2005; OIE, 2015). O vírus provoca alterações no útero e no ovário, normalmente inflamatórias, como salpingites e ovarites que podem prolongar-se por longos períodos de tempo podendo chegar até 60 dias após a infecção (Ssentongo, Johnson & Smith, 1980; Grooms, Brock & Ward, 1998). Todas estas alterações conduzem a um decréscimo da fertilidade ou até mesmo infertilidade e em caso de fêmea gestante, produzem um ambiente incompatível para o desenvolvimento do feto (Grooms, Brock & Ward, 1998).

O mecanismo exato que leva ao decréscimo nas taxas de concepção não está bem esclarecido, mas acredita-se que depende dos eventos reprodutivos que estão a ocorrer no momento da infecção. Sabe-se que a dinâmica ovárica está alterada, que há um crescimento alterado de oócitos que têm menor vitalidade, há alteração na produção de hormonas (Fray *et al.*, 1999; 2000b), há alteração da composição do líquido folicular (Bielanski *et al.*, 1993), o que consequentemente leva a um decréscimo transitório ou permanente da fertilidade e a um aumento na taxa de repetição de cios (McGowan *et al.*, 1993b).

Ao longo dos últimos anos têm sido realizados vários estudos com o intuito de provar que o BVDV produz alterações reprodutivas não só no período gestacional, mas também antes deste.

Num estudo realizado por Whitemore, Zemjanis & Olson (1981), o BVDV não parece inibir a concepção de qualquer bovino seropositivo ou seronegativo quando a inoculação é feita por via oral ou intranasal ou introduzida no útero da vaca seropositiva no momento da reprodução.

No entanto em ensaios realizados mais tarde por Virakul *et al.* (1988), é comprovado que as taxas de concepção são menores em bovinos contaminados durante o período de concepção em relação a bovinos seropositivos antes de iniciarem o novo ciclo reprodutivo, numa percentagem de 44,4% nos primeiros e 78,6% nos últimos.

McGowan *et al.* (1993a) comparou novilhas seropositivas ao vírus com novilhas que contactaram pela primeira vez com o BVDV no período entre a concepção (dia 0) e os 51 dias de gestação e constatou que a taxa de concepção e o sucesso da gestação em animais que eram seropositivos antes de ficarem gestantes é maior que os que sofreram seroconversão nos primeiros dias de gestação (McGowan *et al.*, 1993a; 1993b). Num outro grupo de novilhas

onde foi realizada uma inoculação direta do vírus, as novilhas que foram inoculadas aos 9 dias antes da inseminação tinham taxas de concepção de 44%, enquanto que as novilhas que não foram inoculadas tinham taxas de 79%. Esta redução na taxa de concepção foi atribuída a falha de fecundação ou morte embrionária precoce provocada pelo vírus (McGowan *et al.*, 1993b). Neste mesmo estudo, novilhas que apenas foram expostas a vacas e vitelos PI, 4 dias após a inseminação, verificou-se que a taxa de concepção destas novilhas foi de 60%; aos 77 dias de gestação essa mesma taxa decresceu para 33%. Esta diminuição da taxa de gestação em relação à taxa de concepção inicial foi atribuída à falha na fertilização, bem como à morte embrionária precoce; de realçar que as novilhas que não foram expostas aos bovinos PI apresentavam uma taxa de gestação de 79% (McGowan *et al.*, 1993b).

Num estudo efetuado por Kafi, McGowan & Jillella (1994), foi provocada a superovulação a dois grupos de vacas sendo que um deles foi posteriormente infetado com BVDV; este último sofreu uma diminuição significativa no número de Corpos Lúteos (a principal fonte de progesterona na vaca) palpáveis bem como no número de embriões viáveis quando posteriormente inseminado.

Infeção e subsequente virémia durante a fase pré-ovulatória pode resultar em menor taxa de crescimento folicular (Grooms *et al.*, 1998; Fray *et al.*, 1999;). A infeção pelo BVDV também altera a secreção hormonal ovárica (Fray *et al.*, 1999; Fray *et al.*, 2000b; Fray *et al.*, 2002) e vacas PI geralmente tem os ovários hipoplásicos e com menor número de folículos antrais (Grooms *et al.*, 1996).

Todos estes estudos mostram que a infeção pelo BVDV altera a dinâmica ovárica e essas alterações levam, conseqüentemente, a uma redução na fertilidade, que pode ser temporária ou permanente (Grooms, 2004).

- **Infeção venérea**

A inseminação de novilhas seronegativas e livres de vírus com sémen contaminado com BVDV pode provocar taxas de concepção inicialmente baixas, seguidas de concepções normais, seroconversão contra o vírus e nascimento de vitelos normais sem evidência da infeção (Gondim, 2006).

A presença do vírus no sémen de touros está relacionada com infeções persistentes, mas também com infeções agudas transitórias pós-natais dos touros (Radostits *et al.*, 2000; Evermann & Barrington, 2005; OIE, 2015). Nalgumas situações a qualidade do sémen em

touros infetados pode ser anormal, tendo como resultado a redução da fertilidade (OIE, 2015); noutras, o sémen de um touro PI imunotolerante poderá ser normal e as taxas de gestação das novilhas suas descendentes podem ser normais, sendo que os espermatozoides de um animal infetado não contêm necessariamente o vírus (Liebler-Tenorio, 2005).

Infeções agudas de touros imunocompetentes e seronegativos com o BVDV podem provocar a eliminação do vírus pelo sémen para além do período de virémia (Evermann & Barrington, 2005; Liebler-Tenorio, 2005; Radostits *et al.*, 2000; OIE, 2015;). Infeções testiculares prolongadas e localizadas, com BVDV também tem sido experimentalmente reproduzidas após a infeção aguda de touros com BVDV. O ARN viral foi detetado no sémen durante 2,75 anos após a exposição ao BVDV e o vírus infeccioso produzido a partir de tecido testicular foi detetado até 12,5 meses após a exposição ao BVDV (Givens *et al.*, 2003).

Tanto na infeção aguda, como na infeção persistente, pode ocorrer a deterioração da qualidade do sémen, caracterizada normalmente pela redução da concentração e mobilidade espermática, assim como aumento de anomalias morfológicas dos espermatozoides, facto que resulta na redução da fertilidade, apesar dos indivíduos estarem clinicamente saudáveis (Grooms, 2004; Evermann & Barrington, 2005; Flores *et al.*, 2005). A quantidade de vírus no sémen de um touro com infeção aguda é muito menor do que aquela encontrada no sémen de touros PI (Larson, 2005).

De acordo com Liebler-Tenorio (2005) os locais onde ocorre maior replicação do vírus no trato genital masculino são as vesículas seminais e as glândulas prostáticas, causando a excreção no fluido seminal.

- **Infeção durante o período embrionário: 0-45 dias de gestação**

O vírus ao infetar o feto neste período pode ser responsável pela morte embrionária e aborto, uma vez que induz autólise fetal como consequência direta da sua replicação em órgãos fetais e/ou pela resposta imunitária dos órgãos ao vírus ou ainda por provocar um aumento brusco dos corticosteroides fetais. As vacas gestantes, mesmo em estado subclínico, podem ter abortos causados pelo BVDV que podem acontecer em qualquer fase da gestação mas sobretudo no primeiro trimestre de gestação (Casaro, Kendrick & Kennedy, 1971; Kendrick, 1971; Done *et al.*, 1980; Duffell & Harkness, 1985).

Infeções naturais de novilhas seronegativas, 4 dias após a inseminação, provocam virémia entre 8 a 17 dias e as taxas de concepção e de gestação diminuem, comparativamente

com novilhas não infetadas (Andrews *et al.*, 2004; Brock, 2004; Flores *et al.*, 2005; Liebler-Tenorio, 2005; Gondim, 2006; Kahn, 2010).

Em condições experimentais, ambos os tipos de BVDV (cp e ncp), mostraram-se letais para o feto neste período (Scott, Kahrs & Parsonson, 1972; Done *et al.*, 1980; Duffell *et al.*, 1984; Brownlie, Clarke & Howard, 1989).

Num ensaio feito por Roeder *et al.* (1986), o BVDV foi introduzido numa exploração, tendo-se verificado uma taxa de abortos de 21% durante os 6 meses seguintes.

Dependendo da altura da infeção pode ocorrer reabsorção fetal, mumificação ou expulsão do feto (Casaro, Kendrick & Kennedy, 1971; Done *et al.*, 1980; Evermann & Barrington, 2005). A morte fetal por BVDV ocorre normalmente entre 10 a 27 dias após exposição ao vírus com expulsão do feto 50 dias depois (Murray, 1991). Este intervalo de tempo que medeia entre a morte e a expulsão do feto dificulta ou impossibilita o isolamento do vírus na placenta e no feto, pelo que na maioria das vezes a taxa de abortos por BVDV está subvalorizada (Baker, 1987).

Quando ocorre expulsão do feto logo após a sua morte ou em condições experimentais, as lesões fetais observadas incluem conjuntivite, lesões peribronquiolares, pneumonia interalveolar e miocardite. As lesões placentárias incluem vasculite, edema, congestão e hemorragia. Por vezes pode-se observar degeneração e necrose dos tecidos fetais (Murray, 1991).

As novilhas infetadas em que a conceção fracassou retornam normalmente o estro cerca de 20 dias depois da inseminação (Radostits *et al.*, 2000).

- **Infeção após o período embrionário: 45 -125 dias de gestação**

Os fetos que sobrevivem a uma infeção por BVDV-ncp entre os 45 e os 125 dias de gestação, desenvolvem imunotolerância ao vírus e conseqüentemente tornam-se animais PI's ao BVDV. Isto ocorre neste período porque ainda não houve desenvolvimento do tecido linfóide fetal e desta forma o feto não tem como impedir a replicação vírica e esta ocorre de forma passiva, ou seja não haverá desenvolvimento de anticorpos seroneutralizantes, acabando o animal por assumir o BVDV como se fosse seu, nascendo com infeção persistente (Deregt & Loewen, 1995; Radostits *et al.*, 2000; Swasdipan *et al.*, 2002; Andrews *et al.*, 2004; Brock, 2004; Evermann & Barrington, 2005; Flores *et al.*, 2005; Larson, 2005; Kahn, 2010).

Estes bovinos são a principal razão da manutenção do BVDV na população bovina, pois funcionam como ‘reservatórios’, principal fonte de vírus numa exploração, sendo responsáveis pela maior parte dos casos de transmissão horizontal do vírus – secreções lacrimais e nasais, saliva, urina e fezes (Trávén *et al.*, 1991; Houe, 1995; Wittum *et al.*, 2001; Fairbanks *et al.*, 2004). Os bovinos que nascem persistentemente infetados libertam o vírus continuamente durante toda a sua vida (Moennig & Liess, 1995) e a virémia está sempre presente, no entanto a concentração de vírus no sangue pode decrescer (Fray *et al.*, 2000).

Embora o mecanismo exato para produzir PI ainda não esteja totalmente esclarecido, pensa-se que a circulação do vírus no sangue do feto durante o desenvolvimento do seu sistema imunitário (90-120 dias) é um pré-requisito para se produzir imunotolerância ao vírus. De acordo com Swasdipan *et al.* (2002), o vírus atravessa a placenta e propaga-se pela alantoide e líquido amniótico, seguindo-se o feto, e uns dias mais tarde estabelece uma infecção nas glândulas uterinas. Esta forma de infecção permite, durante a formação do sistema imunitário do feto, que as proteínas virais sejam reconhecidas como antigénios próprios, “self”, o que resulta na rejeição e destruição de linfócitos B e T anti-BVDV. Assim, infecções persistentes ao BVDV parecem surgir de uma imunotolerância específica dos linfócitos B e T ao vírus, o que resulta numa ausência de anticorpos contra o mesmo (Peterhans, Jungi & Schweizer, 2003; Grooms, 2006; Smirnova *et al.*, 2008).

As infecções persistentes só são produzidas pelo biótipo ncp (Brownlie, Clarke & Howard, 1984;1989; Bolin, Littledike & Ridpath, 1991; Peterhans *et al.*, 2010), enquanto que as infecções experimentais com o biótipo cp, não têm produzido bovinos PI (Casaro, Kendrick & Kennedy, 1971; Done *et al.*,1980; Brownlie, Clarke & Howard, 1989). Pensa-se que o BVDV-ncp produz infecções persistentes devido à inabilidade que tem para induzir o útero a produzir o interferão-T, o que se traduz numa forma ótima do vírus evitar a resposta imunitária do organismo e estabelecer uma infecção persistente (Howard *et al.*, 1992). Outro mecanismo também de grande importância para a persistência, é a tolerância das células CD4+ ao vírus (Collen *et al.*, 2002).

Em condições experimentais foram produzidos 100% de animais PI quando a vaca foi infetada aos 75 dias de gestação (Cortese *et al.*, 1998; Brock & Chase, 2000; Brock & Cortese, 2001). De acordo com um estudo realizado por Blanchard *et al.*, (2010) a exposição a BVDV entre os 30 e os 125 dias de gestação resultou em infecção persistente nos vitelos desse estudo, baseado na presença do vírus diagnosticado 6-7 meses após o início de

infecção fetal. No entanto as infecções persistentes raramente ocorrem quando se ultrapassa os 100 dias de gestação (Baker,1995).

- **Infeção durante o período fetal: 125-150 dias de gestação**

A infecção transplacentária do feto aproximadamente entre os 125 e 150 dias de gestação pode provocar defeitos congénitos (Brock, 2004; Flores *et al.*, 2005; Grooms, 2006; Grooms, Baker & Ames, 2006), sendo vulgarmente conhecida por infecção congénita. Este período de desenvolvimento corresponde ao período final da organogénese do sistema nervoso e do desenvolvimento do sistema imunitário do feto, podendo resultar na produção de uma resposta inflamatória na presença do BVDV (Radostits *et al.*,2000; Evermann & Barrington, 2005; Liebler-Tenorio, 2005). Neste estágio de gestação, a infecção pelo BVDV pode inibir o crescimento ou a diferenciação celular ou causar lise celular (Evermann & Barrington, 2005; Grooms, Baker & Ames, 2006). A infecção congénita pode resultar em aborto, embora ocorra menos frequentemente, tendo já sido provado *in loco* através do isolamento de BVDV em 14 fetos abortados nesse período de tempo (Moennig & Liess, 1995).

Os defeitos congénitos mais comuns induzidos pela infecção incluem malformações no sistema nervoso central (microcefalia, hidrocefalia, hipoplasia cerebelar, hipomielinogénese) e deficiências oculares, tais como atrofia da retina, inflamação do nervo ótico, cataratas e microftalmia com displasia da retina, traduzindo-se em vários graus de cegueira após o nascimento.

Animais nascidos com hipoplasia cerebelar são incapazes de permanecerem em estação e os que conseguem mostram ataxia, tremores e movimentos descoordenados. A gravidade das lesões cerebelares aumenta com o aumento dos dias de gestação com os quais o feto foi infetado (Brown *et al.*, 1973).

Pode-se, também, verificar braquignatismo, deformações músculo-esqueléticas, alopecia, hipotricose, artrogripose, restrição ao crescimento, hipoplasia pulmonar e aplasia do timo (Scott *et al.*, 1973; Brown *et al.*, 1975; Radostits *et al.*,2000; Andrews *et al.*, 2004; Brock, 2004; Evermann & Barrington, 2005; Larson, 2005; Liebler-Tenorio, 2005; Grooms, 2006; Blanchard *et al.*, 2010; OIE, 2015). Os vitelos nascidos podem ser mais pequenos que o normal e ter o pêlo encaracolado ou eriçado (Larsson *et al.*, 1991; Agerholm *et al.*, 2015;).

Os mecanismos patogênicos dos defeitos congênitos resultam possivelmente de uma combinação celular direta do dano e da resposta inflamatória do feto ao vírus (Grooms, 2004). O vírus destrói as células nervosas e neurológicas do feto, fazendo com que falhem a sua migração e induzem a destruição do parênquima cerebral. No cérebro, a perda de tecido cerebral e a falha de desenvolvimento leva à formação de lesões por cavitação, conduzindo a hidranencefalia e porencefalia (Grant Maxie & Youssef, 2007; Pavarini *et al.*, 2008).

Lesões vasculares inflamatórias conduzem a edema folial, hemorragias, isquemia e são responsáveis pela destruição da folia cerebelar e por lesões cavitantes no parênquima cerebelar (Grant, Maxie & Youssef, 2007). O resultado destas lesões é um cerebelo de tamanho reduzido conhecido como hipoplasia cerebelar. A hipoplasia cerebelar foi o primeiro efeito teratogênico do BVDV descoberto, sendo documentado pela primeira vez em início dos anos 70 (Ward *et al.*, 1969; Scott *et al.*, 1973; Grooms, Brock & Ward, 1998; Lanyon *et al.*, 2014).

A hipomielinização do cérebro e da substância branca da medula espinhal foi descrita tanto em casos espontâneos, como experimentais, de infecção por BVDV (Done *et al.*, 1980; Binkhorst *et al.*, 1983; Barber, Nettleton & Herring, 1985; Otter *et al.*, 2009). Neste caso, as lesões macroscópicas estão ausentes e a detecção requer exame histológico e confirmação da deficiência de mielina por coloração especial (*e.g.*: Luxol 'fast blue') de tecido do Sistema Nervoso Central (SNC).

A ocorrência de lesões oculares congênitas após infecção pelo BVDV (espontânea ou experimental) em fetos bovinos está normalmente associada à hipoplasia cerebelar (Scott *et al.*, 1973; Bielefeldt-Ohmann, 1984). Macroscopicamente pode também ocorrer microftalmia bilateral e/ou cataratas, displasia da retina e nevrite ótica (Grooms, 2004). Outras malformações congênitas que têm sido associadas ao BVDV incluem hipoplasia do timo, braquignatismo inferior, alterações do pêlo (hipotricose ou alopecia), hipoplasia pulmonar, displasia renal e crescimento retardado (Larsson *et al.*, 1991; Grooms, 2004;).

Em muitos rebanhos, as malformações são as únicas lesões que sugerem a presença do vírus (Flores *et al.*, 2005).

- **Infeção dos 150 dias até ao fim da gestação**

A infecção do feto com o BVDV depois dos 150 dias de gestação causa resposta imunitária e eliminação do vírus (Brock, 2004; Grooms, 2006; OIE, 2015). Nesta último

período de gestação, a imunocompetência e a organogénese estão completas pelo que as infeções por BVDV estão associadas ao nascimento de vitelos fracos, mas normais (Ward *et al.*, 1969; Dubovi, 1994), seropositivos, que têm anticorpos contra o vírus mesmo antes de ingerirem o colostro (Casaro, Kendrick & Kennedy, 1971; Kendrick, 1971; Brock, 2004; OIE, 2015) e que raramente levam ao aborto. Os fetos infetados neste período são capazes de ter uma resposta imunitária efetiva ao vírus, conseguindo eliminá-lo. No entanto, os vitelos têm maior probabilidade de desenvolverem doenças pós-natais graves. Muñoz-Zanzi *et al.* (2003) demonstraram que vitelos que nascem já com um título de anticorpos contra o BVDV apresentam mais doenças respiratórias e digestivas, e estas na forma mais grave, nos primeiros 10 meses de vida, em relação a animais que nascem sem os anticorpos anti-BVDV.

1.3.4.2) Infecção pós-natal

Na infecção pós-natal, os bovinos têm que ter exposição prévia ao vírus (infecção transitória). O vírus multiplica-se nas células com consequente virémia e o organismo reage à infecção acionando os mecanismos de defesa que culminam com a eliminação do vírus (através de secreções e excreções) (Baker, 1987; Dubovi, 1994; Houe, 1999; Lindberg & Alenius, 1999; Lindberg, 2003). Após esse contacto, o animal mantém em circulação anticorpos e linfócitos ‘T memória’ contra o vírus que contactou para que num segundo contacto, a resposta imunitária seja mais rápida e eficaz.

É nesta fase que (dependendo de uma série de fatores de ordem animal, do vírus e do ambiente) o bovino poderá apresentar um quadro clínico de diarreia viral bovina – BVD.

A diarreia viral bovina (BVD) refere-se à infecção aguda em bovinos soronegativos e imunocompetentes, não PI, (Baker, 1987). Afeta geralmente animais de seis meses a dois anos (Potgieter, 2004). Os sinais clínicos podem ser evidentes por 5-7 dias e incluem febre transitória, leucopenia, depressão, anorexia, descarga óculo-nasal, salivação, ocasionalmente erosões e ulcerações orais, diarreia aquosa de severidade variada e, em vacas leiteiras, diminuição da produção de leite (Baker, 1987).

1.4 – Sinais clínicos

O BVDV é um agente infeccioso problemático em qualquer exploração uma vez que está associado a problemas respiratórios, hematológicos, neurológicos, reprodutivos, gastrointestinais, circulatórios, linfáticos, musculoesqueléticos, tegumentários (pele e pêlo) e imunológicos (Duffell & Harkness, 1985; Baker, 1987).

Segundo Laven (2008), a infecção por BVDV é extremamente imunossupressiva, por isso os animais mais jovens ao serem infetados por este vírus, ficam mais sujeitos a infecção por outras doenças infecciosas, nomeadamente doenças respiratórias ou entéricas. Ao imunodeprimir, o BVDV vai permitir o ataque de agentes oportunistas e facilitar a sua ação, surgindo sinais clínicos exuberantes. O *stress* a que o animal está sujeito no momento da infecção é diretamente proporcional ao grau e imunodepressão que o vírus irá causar.

O 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, 2002). Os efeitos sinérgicos das infecções pelo BVDV já foram descritos quando os animais estão concorrentemente infetados com *Mannheimia haemolytica*, herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1), vírus sincicial respiratório bovino, salmonelose, infecções por *Escherichia coli*, estomatite papular bovina, actinomicose, infecções por coronavírus e rotavírus, babesiose, helmintose aguda, metrite e mastite (Pritchard, 1963; Duffell & Harkness, 1985; Dubovi, 1994; Baker, 1995; Kelling *et al.*, 2002b; Evermann & Barrington, 2005; Gondim, 2006).

A imunodepressão causada pelo vírus também pode ser resultado indireto da produção de prostaglandinas pelas células infetadas (Grooms, Baker & Ames, 2006).

Os sinais clínicos que resultam de uma infecção por BVDV são complexos e muito variados, podendo ir desde simples infecções subclínicas a infecções clínicas ligeiras com problemas digestivos e respiratórios, a infecções clínicas graves como a síndrome hemorrágica. Podem ocorrer ainda infecções dos órgãos reprodutivos, principal causa de perdas económicas nas explorações bovinas.

Ambos os tipos de BVDV (tipo 1 e tipo 2) são capazes de provocar infecções subclínicas, clínicas ligeiras ou clínicas graves (Ridpath & Neill, 2000).

A infecção subclínica (forma mais frequente da infecção por BVDV) manifesta-se por febre ligeira durante cerca de 6 a 9 dias após a infecção, leucopenia e produção de anticorpos. O animal é infetado sem nunca mostrar sinais clínicos (por vezes apenas ligeira diminuição

da produção de leite e aumento da temperatura corporal) pelo que, a detecção da infecção só é possível pela presença de anticorpos anti-BVDV no soro. A presença desses anticorpos após a infecção é suficiente para proteger o animal durante vários anos contra a infecção clínica. Ames (1986) estimou que 70% a 90% das infecções por BVDV ocorrem sem manifestação de sinais clínicos. De acordo com um ensaio realizado por Bayne *et al.* (2016) em vitelos infetados subclínicamente com BVDV não foi possível obter grandes diferenças comportamentais entre vitelos infetados e vitelos saudáveis (controle).

Quando ocorre uma infecção por BVDV que resulta em doença – infecção clínica – o animal tem diarreia viral bovina (BVD). Esta fase (fase aguda) ocorre em animais que são infetados após terem adquirido imunocompetência. Normalmente após um período de incubação de 5 a 7 dias, a temperatura corporal sobe aos 40-41°C, retomando ao normal após dois dias. Surge nesta altura uma diarreia aquosa profusa com muito muco, podendo conter sangue. O animal apresenta anorexia, piroxia, depressão, fadiga, descargas óculo-nasais, erosões na cavidade oral, no focinho, mucosa vaginal e nos espaços interdigitais. Em touros, a qualidade do sêmen pode estar diminuída. Alguns animais acabam por morrer devido à desidratação severa, contudo, a mortalidade é baixa. O vírus pode ser encontrado nas secreções nasais e no sangue dos animais 6 a 8 dias após a infecção (Brodersen & Kelling, 1998). Se as infecções forem provocadas por vírus de alta virulência, os títulos virais podem permanecer durante muito mais tempo podendo persistir por mais de 3 meses após a infecção (Brownlie, 1991; Kelling *et al.*, 2002a). Na sequência da imunossupressão provocada pela infecção de BVD, os animais ficam suscetíveis a infecções secundárias provocadas por outros agentes, particularmente as envolvidas na síndrome respiratória bovina (SRB) e na diarreia neonatal.

O BVDV está associado a quase todos os surtos respiratórios bovinos não tanto individualmente mas em sinergismo com *Mannheimia haemolytica* (Potgieter *et al.*, 1984b), herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1) (Potgieter *et al.*, 1984a) e o vírus respiratório sincicial bovino (Brodersen & Kelling, 1998). As infecções respiratórias tornam-se mais graves, estabelecem-se por períodos mais longos de tempo e podem ser refratárias aos tratamentos convencionais (Haines *et al.*, 2001). Os vitelos a partir dos dois meses de idade são mais suscetíveis devido ao decréscimo dos títulos de anticorpos maternos.

Estudos experimentais têm demonstrado que determinados tipos de BVDV têm maior tropismo para os pulmões que outros e por isso são frequentemente isolados em animais com doença respiratória (Potgieter *et al.*, 1985; Hamers *et al.*, 2000^a; Baule *et al.*,

2001). De acordo com Fulton *et al.* (2002), o BVDV-1 tem sido associado à síndrome respiratória bovina (SRB), especificamente o BVDV-1b que foi isolado predominantemente a partir de vitelos com doença respiratória.

As enterites neonatais são consequência do BVDV. Diretamente, o BVDV causa atrofia das vilosidades intestinais do duodeno e inflamação da submucosa intestinal; indiretamente, potencia os efeitos do rotavírus e coronavírus, responsáveis por graves doenças intestinais (Werding *et al.* 1989; Kelling *et al.*, 2002b).

Segundo estudos efetuados, a DM surge no seguimento da mutação da estirpe ncp para a estirpe cp nos animais PI ou após uma superinfecção pela estirpe citopática (Brownlie, Clarke & Howard, 1984; Belák & Ballagi-Pordány, 1991; Hertig *et al.*, 1991; Baker & Houe, 1995; Bolin, 1995a).

O quadro clínico desta doença é de extrema gravidade (fase crónica) e com perdas elevadas, que surge em bovinos PI quando estes são ‘reinfetados’ com um genótipo ou biótipo diferente daquele que o bovino é imunotolerante (Qi *et al.*, 1992; Bolin, 1995a). O ‘novo’ vírus pode ser endógeno, provindo de uma mutação ou recombinação genética de uma estirpe pré-existente no organismo ou pode ser exógeno, resultante de um novo contato com um tipo diferente de BVDV. Os dois genótipos de BVDV são ambos capazes de provocar DM. Esta surge normalmente em animais com menos de 2 anos de idade e caracteriza-se por letargia, pirexia, anorexia, diarreia, úlceras em toda a mucosa nasal, oral, labial, perda da condição corporal e morte (Baker, 1990).

Os animais PI que não apresentam DM, podem estar associados a baixa performance, fraco crescimento, imunossupressão, altas taxas de morbidade e mortalidade (Baker, 1995).

Existem ainda quadros de BVD com evolução hiperaguda, como é o caso da síndrome hemorrágica. Esta forma aguda não é muito diferente da infeção pelas estirpes não-citopáticas do BVDV. Caracteriza-se por trombocitopenia e leucopenia grave, com diarreia sanguinolenta, epistaxis, petéquias, hemorragias equimóticas, hemorragias com apenas picadas de agulhas (de administração) ou picadas de insetos (Corapi, French & Dubovi, 1989), hemorragias das mucosas, hifema e pirexia. Os animais afetados morrem em poucas horas devido à perda de sangue (diátese hemorrágica) (Corapi *et al.*, 1990). Até agora só o genótipo 2 foi associado a esta síndrome (Corapi *et al.*, 1990; Ridpath, Bolin & Dubovi, 1994; Stoffregen *et al.*, 2000).

1.5 – Diagnóstico

A identificação de todos os animais infetados com BVD é um dos passos mais importantes para que, um programa de controlo funcione. O método de diagnóstico escolhido vai depender de diversos fatores: deve-se ter em conta a idade do animal a ser testado, se o teste é feito *ante* ou *post mortem* e se se pretende identificar animais PI. Considerações económicas, incluindo a probabilidade de encontrar um animal PI numa dada população (prevalência esperada), o custo da doença devido à presença de um animal PI e o risco económico da venda de um animal PI para o comprador, terá igualmente impacto na escolha de estratégias de teste de BVD (Larson *et al.*, 2005).

A BVD é diagnosticada a partir dos antecedentes, sinais clínicos e lesões macroscópicas e microscópicas. Muitas vezes, para efeitos práticos ou controlo simples, o diagnóstico laboratorial imunológico é apenas necessário quando os sinais clínicos e as lesões macroscópicas são pouco evidentes (Goyal, 2005; Kahn, 2010).

O tipo de amostras a submeter depende da história clínica e da história da exploração, sendo o historial de vacinações necessário para a interpretação da serologia (Radostits *et al.*, 2000). Para a confirmação do diagnóstico, pode-se enviar para o laboratório colheitas amostras de sangue com anticoagulante, soro, órgãos (baço, timo, intestino e linfonodos), fetos, placentas e placentomas, para além de órgãos e tecidos com lesões macroscópicas (Flores *et al.*, 2005).

A prévia avaliação sobre o caso clínico do animal ou o estado epidemiológico da exploração ajudará a selecionar o teste de diagnóstico mais sensível e específico para a situação em causa. Assim, o pedido de análises laboratoriais é feito quando:

- i. Se suspeita que o quadro clínico do animal é compatível com a DM;
- ii. Se suspeita que o animal é PI ou se se está a rastrear bovinos PI numa exploração;
- iii. Se existem abortos, vacas que repetem cios, nascimentos de vitelos fracos ou com defeitos congénitos;
- iv. Surtos de vitelos com pneumonia ou diarreia;
- v. Diminuição de produção de leite com surgimento de mastites.

A seguinte tabela (tabela 1) indica a razão/motivo para a realização dos testes de diagnóstico primário.

Tabela 1: Relação entre os diferentes motivos e testes de diagnóstico (adaptado de Laven, 2008).

Motivo para Teste	Teste antigénio	Teste anticorpos
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 afetados e não afetados
Doença das Mucosas	Todos os casos	Sem efeito
Rastreio	Testar todos os animais para identificar PI	Testar amostras para identificar suscetibilidade BVDV

Os métodos de diagnóstico do BVDV dividem-se em métodos indiretos e diretos. Os métodos indiretos são utilizados por serem práticos e de baixo custo. Baseiam-se na deteção de anticorpos anti-BVDV no soro ou no leite dos bovinos. Podem ainda ser quantitativos, se nos fornecem informação sobre a quantidade de anticorpos presentes, ou qualitativos, se permitem determinar a presença ou ausência de anticorpos. Os métodos quantitativos dependem da colheita de soros pareados (em que uma amostra é colhida na fase aguda da doença e outra na convalescença) para mostrar o aumento no título de anticorpos. Ao invés, os métodos qualitativos não impõem essa condição sendo, no entanto, necessário assegurar que não houve utilização prévia de vacinas para que a positividade traduza infeções naturais. É importante ressaltar que os métodos indiretos não têm capacidade para detetar animais PI, em função do fenómeno de imunotolerância observado nestes animais que faz com que não tenham anticorpos: a maioria dos métodos para o diagnóstico virológico é comprometida pela interferência dos anticorpos maternos, sendo que os animais PI não são corretamente identificados até que a imunidade colostrual tenha diminuído (Lindberg *et al.*, 2006).

Os métodos diretos baseiam-se na deteção do próprio BVDV ou dos seus componentes (proteínas e ácidos nucleicos) e constituem a forma mais objetiva de diagnóstico da infeção.

Existem diversos métodos de diagnóstico no mercado, desde o isolamento viral a partir de soro, sangue ou outras amostras de tecido, teste de anticorpos fluorescentes (FA) a partir de tecidos, procura de antigénios virais por imunohistoquímica a partir de biópsia de pele (IHQ), método ELISA aplicado a soro, plasma ou solução tampão de fosfato salino, de biópsia de pele (Larson *et al.*, 2005; BonDurant 2007). Um outro método de diagnóstico é

RT-PCR (deteção de antígeno), e segundo Zimmer *et al.* (2004) consegue dar resultados positivos mesmo na presença de um elevado título de anticorpos. Muito destes testes, tal como o isolamento viral, RT-PCR e ELISA, somente detetam a viremia, pelo que os animais testados positivamente terão de ser sujeitos a um novo teste, 3 a 4 semanas depois, de modo a poder diferenciar uma infeção persistente de uma transitória (Larson *et al.*, 2005; Lanyon *et al.*, 2014).

Para diagnóstico de BVDV temos então à disposição os testes:

- 1) Soroneutralização (SNT);
- 2) ‘Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay’ para pesquisa de AC (AC-ELISA);
- 3) ‘Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay’ para pesquisa de AG (AG-ELISA);
- 4) Imunohistoquímica (IHQ);
- 5) Transcriptase Reversa – Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR).

Os testes de soroneutralização (SNT) detetam anticorpos anti-BVDV no soro ou no leite dos animais a serem testados, baseando-se no princípio da inibição dos efeitos celulares nefastos provocados pelo vírus, caso esses anticorpos estejam presentes no material a testar. Estes testes são muito afetados pela diversidade do BVDV, podendo ter resultados variáveis entre laboratórios, como resultado da utilização de diferentes estirpes de vírus (Vaughn, 1997; Dubovi, 2013).

O método ELISA usa a especificidade de uma ligação AG-AC com a sensibilidade de uma reação enzimática, permitindo assim a deteção de quantidades mínimas de uma substância particular e com grande fiabilidade.

O ELISA para deteção de anticorpos (AC) é considerado uma prova rápida e prática podendo ser usado para análise de grande número de amostras, mas não possibilita a diferenciação entre anticorpos produzidos frente a uma resposta à infeção, dos anticorpos vacinais e colostrais (Goyal, 2005). Porém, as principais desvantagens são a produção de resposta cruzada com outros pestivirus e sensibilidade variável conforme o protocolo utilizado (Sandvik, 2005).

Os testes ELISA de pesquisa de antígeno (AG) permitem identificar a presença do antígeno pela deteção específica com anticorpo marcado, a partir de amostras de soro, tecido necropsiado e de biópsia de pele da orelha do animal. São testes comerciais utilizados principalmente na identificação de animais PI. A presença de anticorpos maternos pode reduzir a sua sensibilidade pelo que não é o teste mais indicado para animais com menos de

3 meses de idade pois estes podem ter adquirido os anticorpos de forma passiva pela ingestão de colostro (Fux & Wolf, 2013). Também se tem verificado reatividade cruzada com o vírus ovino da doença da fronteira (*Border Disease*) (McFadden *et al.*, 2012). São vantajosos pela sua especificidade, sensibilidade, rapidez, custo e praticidade (Shannon *et al.*, 1991; Horner *et al.*, 1995; Flores, 2007). Os testes serológicos para pesquisa de AG devem ser realizados em série, com intervalo de tempo de aproximadamente 2 semanas entre cada amostra, para assim podermos distinguir um animal com uma infeção aguda, de um animal PI (Holm *et al.*, 2004). A presença de grande quantidade de anticorpos em circulação complica a deteção do vírus ou antígenos virais no soro ou nos leucócitos. Estes anticorpos podem resultar de uma resposta humoral ou podem ter sido adquiridos de forma passiva. O facto de existirem anticorpos em circulação vai impedir a correta identificação destes animais pelo teste ELISA, uma vez que os determinantes antigénicos das partículas virais em circulação, onde se ligam os reagentes do ELISA (ligação AG-ELISA), vão estar ocupados pelos anticorpos circulantes.

A imunohistoquímica é um dos métodos mais populares de deteção de antígeno nos E.U.A (Driskell & Ridpath, 2006) e com crescente utilização, porque tem-se mostrado ser mais prático que os restantes testes e por detetar animais PI com 100% de sensibilidade, quando se utiliza biopsias de pele de orelha (Cornish *et al.*, 2005). É mais utilizado no rastreio de animais jovens, permitindo detetar o vírus, mesmo na presença de AC maternos. De acordo com Cornish *et al.* (2005), o IHQ permite detetar o BVDV em amostras de tecido, muito tempo após o período de virémia aguda. Além disso, esta técnica oferece alta sensibilidade, tornando-a adequada para testar amostras com quantidades de vírus potencialmente baixas tal como amostras de leite, amostras combinadas de soro ou plasma a partir de animais transitoriamente infetados, bem como animais PI ou outros materiais biológicos (Houe, Lindberg & Moennig, 2006). Enfrenta desvantagens na medida em que é restrito a amostras de tecidos, é de trabalho intensivo, é propenso a erro técnico, baseando-se num sistema de pontuação subjetiva, requer pessoal experiente para assegurar a precisão (Cornish *et al.*, 2005; Driskell & Ridpath, 2006) e não é fiável para utilização em amostras armazenadas em formalina por períodos superiores a 15 dias (Khan *et al.*, 2011).

A técnica de RT-PCR é o método de diagnóstico do BVDV mais utilizado, seguido ao ELISA; este deteta e amplifica sequências genéticas que são únicas para o vírus do BVDV. Para se amplificar a molécula de ARN é preciso inicialmente usar uma enzima (Transcriptase Reversa) para sintetizar moléculas de ADN complementar (cADN) e depois amplifica-lo pela

Reação da Polimerase em Cadeia (RT-PCR). A precisão do teste PCR depende da capacidade dos iniciadores (*primers*) do Kit do PCR, de se ligarem especificamente ao material genético único do organismo que se quer identificar (el-Kholy *et al.*, 1998). O teste RT-PCR deteta animais PI, animais com infecção aguda e animais vacinados com uma vacina viva modificada. É o método mais sensível na detecção de BVDV, mas está sujeito a falsos positivos por contaminação das amostras (Horner *et al.*, 1995; Hilbe *et al.*, 2007; Dehkordi, 2011).

Em países onde a prevalência do BVDV é muito baixa e é proibida a utilização de vacinas, a pesquisa de AC por ELISA é um método de diagnóstico bastante usado que permite avaliar o estado sanitário de uma exploração e se existem animais PI na mesma.

Nas explorações recentemente infetadas um dos objetivos é identificar as vacas gestantes que estão em risco de parir um vitelo PI, de modo a tomarem-se as devidas medidas para impedir a propagação do vírus na exploração. As vacas gestantes com um elevado risco de serem ‘transportadoras’ de um feto PI podem ser diagnosticadas serologicamente. Este método baseia-se no facto das fêmeas gestantes de animais PI possuírem um elevado nível de anticorpos, sobretudo no último trimestre da gestação. Lindeberg *et al.* (2001) sugere a detecção de bovinos PI antes de nascerem pela titulação de anticorpos anti-BVDV nas mães, no final da gestação. Outra alternativa é analisar o fluido fetal, obtido na fase final da gestação, através da técnica RT-PCR ou isolamento viral (Lindeberg, 2003).

1.5.1- Diagnóstico diferencial

Por conta da ampla sintomatologia da doença causada pelo BVDV, juntamente com as suspeitas de infeções associadas, existe a necessidade da realização de outros tipos de diagnósticos, com intuito de diferenciá-la de outras doenças etiologicamente distintas. Por isso a prevalência e epidemiologia dessas doenças deverão ser ponderadas no momento do diagnóstico.

A manifestação clínica da infeção estabelecerá o diagnóstico diferencial. A BVD pode ser diferenciada da febre aftosa (*Aphthovirus*), febre catarral maligna (*Rhadinovirus*), estomatite papulosa (*Parapoxvirus*), estomatite vesicular (família *Rhabdoviridae*), peste bovina (*Morbillivirus*), infeções por *Adenovirus* e disenteria bovina.

Já nos vitelos recém-nascidos o diagnóstico diferencial deve ser feito para rinotraqueíte infecciosa bovina sistémica (Grooms, Baker & Ames, 2006).

A febre catarral maligna e a peste bovina apresentam erosões bucais e diarreia, enquanto a febre aftosa, estomatite vesicular, língua azul, estomatite papular bovina e estomatite necrótica apresentam lesões, sem diarreia. Por outro lado, a salmonelose, disenteria invernã dos bovinos, doença de Johne's, deficiência de cobre, coccidiose, intoxicação arsênica e ingurgitamento por hidratos de carbono apresentam-se com diarreia e sem lesões orais (Radostitis *et al.*, 2002).

Na tabela 2 está indicada a diferenciação clínica do aborto causado pela BVD de outras causas de perdas fetais.

Tabela 2: Diferenciação clínica do aborto causado pela BVD (adaptado de Radostitis *et al.*, 2002).

Doença	Período provável de ocorrência de aborto
BVD	< 3º trimestre
Brucelose	+ 6 meses
Tricomoníase	2-4 meses
Neosporose	3-8 meses (média de 5,5 meses)
Vibriose	5-6 meses
Leptospirose	Tardio, + 6 meses
Micoses	3-7 meses
Listeriose	Aproximadamente 7 meses
IBR	Tardio, 6 meses
Aborto viral epizoótico	6-8 meses
Micoplasmose	3º trimestre
Clamidofilose	+ 7 meses
Língua azul	Variável
Bactérias oportunistas	2º trimestre
Salmonelose	4-9 meses

1.6 – Prognóstico e tratamento

O prognóstico do BVDV é sempre reservado nomeadamente no início do aparecimento dos sinais clínicos. Além disso é uma incógnita o rumo que a infeção irá tomar; dependerá da forma como o bovino infetado reage ao vírus, qual a estirpe do BVDV presente e as suas consequências e ainda a possibilidade de haver infeções secundárias.

Não existe tratamento específico, estando apenas indicada terapia de suporte ou de combate às infeções secundárias. O prognóstico nos casos mais graves de diarreias aquosas, lesões orais graves, rápida desidratação e fase crónica da DM é desfavorável. Nestas situações são consideradas as hipóteses de abate sanitário. No caso da síndrome hemorrágica devido à

trombocitopenia poderá ser tentada a transfusão sanguínea, antibioterapia e corticoides, mas o sucesso é muito reduzido (Stilwell, 2013). Poderão ser tomadas medidas que evitem as infeções secundárias, e caso elas existam deverão ser tratadas com recurso a antibióticos de largo espectro, fluidoterapia, eletrólitos, suplementos e vitaminas (Roeder & Harkness, 1986; Radostits & Littlejohns, 1988).

No caso de animais imunocompetentes não existe necessidade de tratamento porque a evolução é geralmente benigna.

Todo o combate e tentativa de erradicação da BVD têm como base a identificação e eliminação dos animais PI.

1.7 – Controlo do BVDV

O sucesso do controlo e prevenção da BVD depende da implementação de programas de saúde adaptados para evitar a introdução da infeção na exploração, identificação e eliminação de animais PI e vacinação de animais reprodutores (Radostits *et al.*, 2000; Kelling, 2004; Brock, Grooms & Givens, 2005; Grooms, 2006; Kahn, 2010). Este controlo pode efetuar-se tanto a nível do rebanho, como a nível nacional (OIE, 2015).

Mas, antes de se iniciarem ações contra o BVDV é necessário fazer uma avaliação da exploração onde se pretende atuar. Deve-se também calcular a presença de outros agentes infecciosos e as consequências dos mesmos na manada, bem como a relação custo/benefício ainda antes de dar início a qualquer programa de controlo.

Sabe-se que as perdas reprodutivas são atualmente as perdas económicas mais importantes. O impacto primário de uma infeção por BVDV em explorações leiteiras é a redução de produção de leite (menos 8500 litros por cada 40 vacas) (Fourichon *et al.*, 2005). Isto resulta, em grande parte, dos efeitos reprodutivos do vírus, nomeadamente os retornos ao cio e abortos que tem grande influência na eficiência da produção de leite. A título ilustrativo refira-se que o lucro das explorações pode diminuir 3% a 4% se a primeira inseminação, em média, ultrapassar os 70 dias pós-parto (Sørensen & Østergaard, 2003); quantificando por vaca, sabe-se que cada animal que não está gestante prejudica o retorno da exploração em 2,30€/dia (Galligan, Groenendaal & Mulder, 2004). Adicionalmente sabe-se que as mamites adquirem maior impacto nas explorações com BVDV (até 7% de aumento) e este aumento é claramente resultado do efeito depressor das defesas imunitárias, exercido

pelo vírus (Houe, 2003). Outro impacto é o aumento da mortalidade dos vitelos (englobando animais que morrem antes dos 2 anos de idade), bem como os custos inerentes ao tratamento dos mesmos (Fourichon *et al.*, 2005). Traduzindo em custos estimam-se perdas de 10,7€ a 19€/vaca/ano (Gunn, Stott & Humphry, 2004).

À semelhança do que ocorre nas explorações leiteiras, nas explorações de carne os prejuízos também se devem às perdas reprodutivas e a imunossupressão causados pelo BVDV. A longo prazo é possível estimar o impacto económico e, considerando os efeitos acumulados ao longo de 10 anos, pode-se apontar para perdas da ordem dos 58€/vaca no primeiro ano e 100€/vaca, no segundo ano (Gunn, Stott & Humphry, 2004). Quando analisado o impacto económico do BVDV, a nível nacional, conclui-se que o prejuízo pode ir até cerca de 3000 €/exploração/ano (Muñoz-Zanzi *et al.*, 2003).

As perdas económicas devem-se quase sempre a infeções congénitas, perdas de peso dos animais que nascem e que têm crescimento lento, perdas pelo aumento da incidência de doenças respiratórias, gastrointestinais e metabólicas como mamites, metrites e retenções placentárias, taxas de refugo dos animais em idades precoces, assim como pelo surgimento de animais com DM e conseqüente morte (Muñoz-Zanzi *et al.*, 2003). Além disso o BVDV tem efeitos negativos na reprodução, provocando taxas de conceção baixas, mortes embrionárias, abortos, defeitos congénitos e nascimento de vitelos fracos. A infeção destes animais em determinado período de tempo pode levar à criação de bovinos persistentemente infetados ao vírus, o que faz deles reservatórios e fontes primárias do vírus (Kelling *et al.*, 2000; Wittum *et al.*, 2001).

O reconhecimento da existência de animais persistentemente infetados ao BVDV foi o primeiro passo para a implementação de programas de controlo e prevenção realmente eficazes (McClurkin, Coria & Cutlip, 1979; Brownlie, Clarke & Howard, 1984; McClurkin *et al.*, 1984). Desde então a identificação, remoção e prevenção do surgimento de animais PI numa exploração tem-se tornado o principal objetivo dos programas de prevenção e controlo.

Atualmente, o modelo padrão no âmbito do controlo do BVDV é baseado na combinação de três medidas profiláticas, sendo a primeira a adoção sistemática de medidas de biossegurança, que possuiu papel central no controlo do vírus a fim de evitar a sua entrada nos rebanhos. Segundo, a deteção e eliminação dos animais PI, reduzindo com isso a circulação do vírus no rebanho, já que estes são considerados os principais disseminadores, e como terceira a vacinação, que tem sido muito utilizada no controle e prevenção, e extremamente indicada para animais livres que estão em áreas que apresentam a doença

endémica, tendo a finalidade de prevenir a infeção fetal, evitando a consequente produção de vitelos PI. Desta maneira, essas medidas preventivas tornam-se constituintes vitais dos programas de controlo do BVDV (Flores, 2003; Lindberg, 2003; Brock, Grooms & Givens, 2005; Laureyns, Ribbens & Kruif, 2010; Stahl & Alenius, 2012).

1.7.1) Medidas de biossegurança e biocontrolo

A 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 é 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.

O biocontrolo é o conjunto de ações tomadas quando o vírus já está presente na exploração e é preciso controlá-lo de modo a que não se disperse, não provoque um surto de doença na exploração e seja eliminado. Teoricamente é possível eliminar o vírus de qualquer exploração; em termos reais, é mais complicado e nem sempre se consegue pois existe o movimento de animais entre explorações ou entre lotes diferentes de animais dentro da mesma exploração (Kelling *et al.*, 2000); podem ainda existir animais gestantes a carregar fetos PI ou animais transitoriamente infetados e as infeções também podem ocorrer pela entrada de material infetado na exploração, como sémen ou vacinas.

Sendo assim é necessário:

- Criar regras ou um protocolo rígido para controlar o movimento de animais entre explorações e dentro da mesma exploração, sendo aqui importante o papel do médico veterinário no aconselhamento e formação dos produtores sobre as medidas a ter na exploração para controlo desta virose;

- O gado de uma exploração deve estar protegido da exposição ao gado de outras explorações vizinhas, que poderão ter animais temporariamente ou persistentemente infetados (*e.g.* contacto direto pelas cercas);

- Aquando da compra de bovinos não rastreados para o BVDV, estes deverão ser sujeitos a uma quarentena, no mínimo de 30 dias antes da sua introdução na exploração; este período é indispensável para garantir que a manada não seja infetada, caso se trate de um bovino com infeção aguda; se os bovinos que entrarem na exploração estiverem gestantes,

estes deverão ficar em quarentena e o parto deverá ser realizado longe dos outros bovinos, para o caso do feto ser PI, e não haver contacto de secreções contaminadas com o vírus, com a restante manada; o recém-nascido deverá ser testado e rastreado antes de se juntar aos restantes vitelos;

- Explorações que tenham recentemente eliminado BVDV, lentamente tornam-se mais suscetíveis de virem a ter uma reinfeção; se o programa de controlo integrar vacinação contra o vírus, o risco será minimizando, podendo, no entanto, acontecer falhas na proteção fetal; a utilização contínua de vacinas irá reduzir as consequentes perdas por reinfeção;

- Monitorizar produtos biológicos como sémen, embriões, sangue, colostro, responsáveis pela transmissão do BVDV; roupa de visitantes, equipamentos ou outras fontes onde o vírus possa vir, também devem ser monitorizadas;

- Considerar a transmissão do BVDV por outros animais como ovinos, caprinos, ruminantes selvagens e suínos tendo em conta o facto do BVDV ter sido detetado nos mesmos, embora o modo de transmissão ainda não esteja conhecido (Carlsson & Belák, 1994; Vilcek *et al.*, 1997); o BVDV já foi isolado em suínos, no entanto a importância do porco como fonte de vírus ainda não foi determinada (Terpstra & Wensvoort, 1988; Liess & Moennig, 1990; Tao *et al.* 2013).

1.7.2) Eliminação de animais PI

Os programas de controlo para BVDV dependem, em grande parte, da deteção de animais PI, da sua eliminação e na prevenção do nascimento de PI. Sem que seja realizada uma rápida eliminação de todos os animais PI, um programa vacinal não terá qualquer benefício (Mota, 2009). A presença de apenas um animal infetado coloca todo o efetivo em risco. Assim, um método realmente eficaz de controlo deste vírus nas explorações, já provado em vários países da Europa, onde foi implementado, é a Testagem e Abate (TA) de todos os bovinos PI identificados.

Com o melhoramento dos testes de diagnóstico e desenvolvimento de métodos para testagem em larga escala, a Testagem e Abate tem sido cada vez mais utilizada, principalmente para populações bovinas não vacinadas. De acordo com Bolin (1995b) ao compararmos taxas de BVDV em países em que maioritariamente se faz vacinação e países

onde se usa a técnica TA (e.g. países escandinavos), chega-se à conclusão que a taxa de prevalência do BVDV é marcadamente menor nos países que utilizam o último método.

Recentemente foi aprovada legislação para a Região Autónoma dos Açores - Portaria n.º 56/2016 de 21 de junho (anexo 1) no âmbito do Programa de Controlo da BVD e que estabelece um prazo máximo de 15 dias úteis após a comunicação do Serviço de Desenvolvimento Agrário de Ilha, para o criador proceder ao abate do animal PI, obrigatoriamente.

1.7.3) Vacinação

O método mais utilizado em vários países para o controlo do BVDV é a vacinação, tendo-se mostrado eficaz na diminuição dos gastos no tratamento desta doença, bem como na prevenção de infeções transplacentárias (Hamers *et al.*, 2000b; Hamers *et al.*, 2002). A sua utilização permite diminuir em frequência e intensidade o aparecimento de sinais clínicos na presença de infeção, uma vez que aumenta a resposta imunitária do animal infetado ao vírus, tornando-a mais rápida e eficaz (Bolin, 1995b). Limita ainda a replicação do vírus nos órgãos e assim diminui a alteração dos mesmos. Tem também um papel importante nas infeções fetais, prevenindo as perdas reprodutivas (mortes embrionárias, nascimentos de animais com infeções persistentes, abortos, defeitos congénitos e nascimentos de vitelos fracos) (Harkness, 1987; Kelling *et al.*, 2000).

As vacinas administradas antes da conceção diminuem a infeção fetal e o nascimento de animais PI uma vez que permitem aos animais terem tempo suficiente para produzir resposta imunológica consistente, além de serem eficazes no impedimento da virémia, diminuído a excreção do vírus e sua transmissão (Cortese *et al.*, 1998; Brock & Cortese, 2001; Thurmond, Muñoz-Zanzi & Hietala, 2001; Zimmer *et al.*, 2002).

Existem basicamente dois tipos de vacinas para o BVDV – vacinas vivas modificadas e inativadas.

As vacinas vivas modificadas são compostas por estirpes atenuadas, pelo que a replicação do vírus é reduzida, diminuindo assim a virulência e a eliminação do vírus da vacina pelo animal vacinado (Radostits *et al.*, 2000). Uma das vantagens deste tipo de vacinas é devida ao antigénio ser amplificado por replicação, no animal, pois será apenas necessário um número pequeno de partículas virais, tornando-se uma vacina económica, necessitando apenas de uma dose para uma imunização adequada. A duração da imunidade também

constitui uma vantagem para este tipo de vacinas, pois tendem a induzir uma resposta imunitária mais forte. Pelo contrário, as vacinas vivas modificadas têm como desvantagens a falha na imunização, se a vacina for armazenada ou manipulada incorretamente, bem como poderá causar a doença, se o vírus recuperar a virulência. Outra desvantagem é a sua suscetibilidade para a inativação através de produtos químicos e/ou exposição a altas temperaturas (Radostits *et al.*, 2000; Kelling, 2004; Fulton, 2005; Grooms, Baker & Ames, 2006; OIE, 2015).

Por sua vez, no processo de produção das vacinas vivas modificadas é utilizado como suplemento para crescimento de culturas celulares, o soro fetal bovino proveniente de diferentes partes do mundo, aumentando o risco de serem contaminadas com estirpes ncp e, deste modo, permitirem a introdução de estirpes exóticas (Brock *et al.*, 2006; Fulton, 2005; Lindberg *et al.*, 2006; Moennig & Brownlie, 2006).

As vacinas vivas modificadas contaminadas com o genótipo BVDV-2 têm o potencial de gerarem surtos da doença quando inoculadas em animais suscetíveis (Falcone *et al.*, 2003). Assim, quando as vacinas são utilizadas num esquema de controlo sistemático, tem que ser mantido um alto nível de higiene (Lindberg *et al.*, 2006). As vacinas vivas modificadas são potencialmente patogénicas para o feto e não deverão ser administradas em vacas gestantes (Bolin, 1995b). Os efeitos possíveis são variáveis e dependem do período de gestação em que a vacinação ocorre. Este tipo de vacinas induz a supressões prolongadas dos mecanismos de defesa do hospedeiro (funções neutrofílicas e linfocíticas), pelo que a imunossupressão e recombinação genética são outros riscos associados às vacinas vivas modificadas (Radostits *et al.*, 2000; Kelling, 2004; Fulton, 2005; Grooms, Baker & Ames, 2006; OIE, 2015). Além disso, animais que estejam em *stress*, não devem ser sujeitos a uma vacinação com este tipo de vacina, pois pode potenciar outro tipo de infeções virais ou bacterianas. Os anticorpos anti-BVDV presentes no colostro conseguem neutralizar o BVDV da vacina viva modificada, bloqueando a indução da resposta imune protetora (Kelling, 2004; Thurmond, 2005).

O desenvolvimento de vacinas inativadas é estimulado pelas desvantagens das vacinas vivas modificadas (Radostits *et al.*, 2000). Estas vacinas trazem vantagens pois incluem a falta de infecciosidade, presença improvável de agentes adventícios, ausência de doença pós-vacinal, bem como a utilização segura em vacas gestantes. Porém, os altos custos da vacina, a indução de uma resposta dos anticorpos neutralizantes mais fraca e a duração da proteção mais curta, necessitando de uma outra aplicação (*booster*) para maximizar a resposta

e reforços periódicos com intervalos de 3 a 4 semanas para alcançar a imunização primária, constituem as suas maiores desvantagens (Radostits *et al.*, 2000; Kelling, 2004; Fulton, 2005; Grooms, Baker & Ames, 2006; Rocha, 2009). De acordo com Radostits *et al.* (2000), com a utilização deste tipo de vacinas, pode ocorrer reações adversas no local de administração, nomeadamente reações anafiláticas, normalmente associadas ao adjuvante presente na vacina. Os anticorpos maternos podem interferir com a vacina inativada e os vitelos devem ser revacinados periodicamente a partir dos 6 meses de idade, até antes de se reproduzirem (Brock & Chase, 2000; Grooms, Baker & Ames, 2006). Contudo, as vacinas inativadas são geralmente seguras em fêmeas gestantes, pelo que os programas vacinais sugerem preferencialmente este tipo de vacinas durante a gestação (Fulton, 2005). Uma outra desvantagem é que a resposta imunitária é também dirigida apenas contra certas variantes de antígeno do vírus (Kelling, 1996).

Atualmente a aposta é na utilização de vacinas marcadas que têm como principal vantagem a distinção dos animais imunizados, em relação aos animais infetados com o vírus de campo, quando se utilizam os testes serológicos apropriados. Assim, este tipo de vacinas é útil, por exemplo, em vacinações de emergência após um surto, reduzindo a necessidade de abater animais no perímetro do surto (Moennig & Brownlie, 2006). Apesar das vacinas marcadas serem mais caras que as vacinas convencionais, poderão ser consideradas como um bem valioso em programas de controlo sistemático, nomeadamente em programas de erradicações regionais e nacionais, fornecendo uma melhor proteção fetal e uma diferenciação adequada entre os animais vacinados e imunizados e os infetados no diagnóstico laboratorial. São úteis para monitorizar o progresso do programa, além de evitarem a eliminação de animais que adquiriram anticorpos previamente, através da vacinação e não por infeção, como acontece com as vacinas convencionais. O desenvolvimento das vacinas marcadas contra o BVD deverá ter em atenção o suficiente desenvolvimento da proteção fetal (Moennig & Brownlie, 2006).

A escolha do tipo de vacina deverá ser feita de acordo com as suas vantagens e desvantagens, bem como de acordo com as necessidades da exploração onde vai ser aplicada. De acordo com Kelling (2004) a seleção da vacina a utilizar em cada sistema de produção efetua-se de acordo com as seguintes variáveis: resposta imunitária; reatividade cruzada; proteção fetal; duração da imunidade; imunossupressão; reversão da virulência; efeito dos anticorpos maternos na resposta imune; e, grau de pureza (tabela 3).

Tabela 3: Comparação entre vacinas vivas modificadas e vacinas inativadas (em: <http://www.bvd-info.ch/veterinarians/vaccination.html>).

Caraterísticas	Vacina viva-modificada	Vacina inativada
Resposta imunitária	Rápida	Lenta e menos eficaz
Produção de AC neutralizantes do vírus	Aumentada	Diminuída
Reação cruzada	Produz	Produz
Duração da proteção	Longa (até 18 meses)	Curta
Proteção fetal	Satisfatória	Questionável
Imunodepressão	Possível	Não provoca
Virémia	Possível	Não provoca
Fácil contaminação e recombinação	Sim	Não
Interferência com os AC maternos	Sim	Sim
Fetopatogénicas	Possível	Não

A vacinação só por si não se mostra ser eficaz no controlo e na eliminação de BVDV das explorações. Este facto é devido a poderem ocorrer nascimentos de bovinos com infeções persistentes em manadas vacinadas contra o BVDV, na medida que as vacinas dão proteção fetal de forma incompleta (Kelling *et al.*, 1990; Van Oirschot, Brusckke & Van Rijn, 1999; Van Campen *et al.*, 2000; Stilwell, Matos & Carolino, 2007; Mota, 2009).

Um dos problemas apontados para o fracasso da vacinação nos programas de controlo, é a diversidade de BVDV e a possibilidade de não existirem reações cruzadas entre estirpes vacinais (Harkness *et al.*, 1987; Meyling *et al.*, 1987; Bolin, Littledike & Ridpath, 1991; Van Campen *et al.*, 2000).

Vários têm sido os estudos realizados no âmbito da vacinação para o BVDV e que tem permitido concluir que uma vacina para um determinado genótipo de BVDV não é suficiente para atribuir 100% de proteção fetal contra outro genótipo (Kelling *et al.*, 1990; Brownlie *et al.*, 1995; Cortese *et al.*, 1998; Van Oirschot, Brusckke & Van Rijn, 1999; Van Campen *et al.*, 2000; Brock & Cortese, 2001; Zimmer *et al.*, 2002). Tanto as vacinas vivas modificadas como as inativadas provocam reações cruzadas, no entanto a proteção é maior para BVDV-1 do que BVDV-2 (Brock & Cortese, 2001). De acordo com Brownlie *et al.* (1995), Brusckke, van Oirschot & van Rijn (1999) e Zimmer *et al.* (2002), as vacinas inativadas dão até 100% de proteção fetal contra o tipo 1. Em ensaios realizados com dois tipos diferentes de vacinas vivas modificadas contra o BVDV-1 obteve-se proteção fetal a variar entre 83% e 92% (Cortese *et al.*, 1998; Dean *et al.*, 2003).

Para além dos problemas nas reações cruzadas, o problema da imunidade passiva obtida pela ingestão do colostro pode interferir na proteção atribuída pelas vacinas. As altas concentrações de anticorpos maternos contra determinado tipo de BVDV podem bloquear a resposta imunitária à vacina (Ellis *et al.*, 2001). Há, por isso mesmo, a preocupação de que vitelos vacinados muito cedo, ainda com imunidade adquirida pelo colostro, não fiquem totalmente imunizados com a vacina, por interferência dos anticorpos maternos (Bolin, 1995b).

Estudos têm mostrado que os animais podem desenvolver imunidade ativa mesmo na presença de anticorpos maternos. Esta teoria ficou evidenciada por Ridpath *et al.* (2003) quando testou vitelos vacinados contra BVDV que tinham ingerido colostro enriquecido com AC contra o BVDV; estes mostraram-se resistentes, continuando com resposta imunitária forte mesmo depois dos AC maternos terem desaparecido. Contudo, suspeita-se que esta resposta tenha sido totalmente mediada por células, uma vez que nenhuma resposta humoral foi detetada.

A eficácia das vacinas pode ser avaliada pela capacidade que tem de provocar diminuição dos sinais clínicos, numa população de animais vacinados, comparando a outros animais com a mesma estirpe e não vacinados (Brock & Cortese, 2001). Mas tendo em conta a utilização de animais e a dificuldade em quantificar os sinais clínicos, a eficácia das vacinas só pode ser avaliada pela neutralização do vírus pelos anticorpos presentes no soro.

O uso de vacinas em Portugal contra o BVDV ainda é incipiente e é realizado de forma irregular nas diferentes regiões e sistemas de produção. A título ilustrativo referenciam-se as vacinas utilizadas em Portugal (tabela 4).

Tabela 4: Vacinas utilizadas em Portugal contra o BVDV.

Tipo	Nome comercial	Representante
Vacinas inativadas monovalentes	Bovilis BVD®	MSD Animal Health, Lda.
	PregSure BVD®	Laboratórios Pfizer, Lda.
Vacinas inativadas associadas	Hiprabovis 4 ®	Laboratórios Hipra, S.A. Espanha (Arbuset)
	Rispoval 4®	Zoetis Portugal, S.A.
	Triangle 4+Ph-K ®	Boehringer - Ingelheim. Vetmedica Inc.
	Triangle 9®	Boehringer - Ingelheim. Vetmedica Inc.
Vacinas vivas	Bovela ®	Boehringer - Ingelheim. Vetmedica Inc.

3 - Material e métodos

3.1 – Caracterização das explorações leiteiras

Existem cerca de 7700 bovinos nas ilhas das Flores e Corvo, distribuídos por 372 explorações das quais 30 são explorações leiteiras (24 na ilha das Flores e 6 na ilha do Corvo). Neste estudo todos os bovinos de todas as explorações leiteiras (n=30) foram testados para a presença de anticorpos contra a BVD e para a presença de BVDV. A seroprevalência e prevalência de BVDV foram determinadas testando 277 bovinos da ilha das Flores e 17 da ilha do Corvo.

Foram colhidas amostras de sangue em vacas leiteiras bem como em vitelos, machos reprodutores e fêmeas reprodutoras. Estas colheitas foram realizadas entre setembro e dezembro de 2015 tendo sido efetuadas pelas brigadas do Serviço de Desenvolvimento Agrário das Flores e Corvo – SDAFC e das quais o autor também fez parte. Todas as explorações leiteiras estavam sob campanhas oficiais de saneamento.

3.2 – Recolha de dados e caracterização da amostra

A recolha das amostras de sangue foi realizada de acordo com o ‘Procedimento Técnico de Colheita e Envio de Amostras para Testes Imunológicos’ do Laboratório Regional de Veterinária da Região Autónoma dos Açores (Direção Regional do Desenvolvimento Agrário, Direção de Serviços de Veterinária) (Anexo 2).

O sangue foi colhido por punção da veia coccígea de cada animal. Foram utilizadas agulhas hipodérmicas descartáveis esterilizadas (agulha hipodérmica Vacutest®Kima, 18G x 1") e sistema de vácuo, em tubos esterilizados, sem anticoagulante (exceção do sangue de vitelos em que foi utilizado anticoagulante EDTA), com capacidade para 15 ml, num volume de sangue de 9 ml no máximo, o que corresponde a 60% do tubo, visando melhorar a obtenção do soro.

As amostras de sangue foram identificadas no momento da colheita, em impresso próprio, especificando o tipo de ensaio pretendido e o número de identificação do animal. Posteriormente as amostras foram acondicionadas à temperatura ambiente, protegidas do calor e do frio excessivo, de forma a permitir a retração do coágulo. À chegada ao laboratório foram centrifugadas a 2500 rpm durante 10 minutos, foi-lhes retirado o soro para novo tubo

e imediatamente congeladas a – 20°C. Foram depois enviadas para o Laboratório Regional de Veterinária (LRV) em Angra do Heroísmo (ilha Terceira), onde foram realizados os testes laboratoriais. As amostras foram acompanhadas de uma folha de registo de dados contendo: marca oficial da exploração; nome do produtor; número de identificação fiscal; número do bilhete de identidade ou cartão do cidadão; localização da exploração; efetivo; classificação do estatuto sanitário da manada; marca auricular dos animais; sexo; idade e a data da intervenção.

No caso dos vitelos (idade igual ou inferior a 6 meses) foi feita a colheita de sangue com anticoagulante (EDTA) para pesquisa de antigénio usando a técnica de RT-PCR, já que a presença de anticorpos maternos (adquiridos de forma passiva pela ingestão de colostro) pode interferir nos exames sorológicos e originar um resultado ‘falso-positivo’. Devido a essa interferência, a melhor amostra a ser utilizada é o sangue total pois consegue-se mais facilmente o isolamento do vírus utilizando células mononucleares isoladas e preferencialmente sem congelamento. Neste caso as amostras foram enviadas o mais rapidamente possível para o LRV, evitando-se assim a sua congelação.

Nenhum dos animais analisados foi, em qualquer momento, vacinado contra o BVDV. A idade dos animais variou entre 2 meses e 185 meses (15,4 anos).

3.3 – Sorologia

As amostras de sangue recolhidas foram utilizadas na deteção de anticorpos do vírus BVD e do antigénio, permitindo a identificação de animais persistentemente infetados (PI). O método de diagnóstico laboratorial utilizado no primeiro caso foi o método imunoenzimático ELISA-Ac (identificação de anticorpos por ELISA) e no segundo caso o método de biologia molecular ‘Real Time PCR’ (RT-PCR) tal como descrito no “Manual de Testes de Diagnóstico e Vacinas para Animais Terrestres, Organização Mundial de Saúde Animal” (OIE, 2015).

A deteção de anticorpos do BVDV no soro das amostras colhidas através do método ELISA⁽¹⁾ (técnica ELISA indireta – método PTVir07) (Howard *et al.*, 1985) foi feita através do *kit* comercial ‘IDEXX BVDV total AbTest’. Este método deteta pequenas quantidades de anticorpos específicos que geralmente não são detetáveis pelos métodos convencionais.

⁽¹⁾ Ensaio Acreditado pela NP EN ISO/IEC 17025:2005.

Para a pesquisa do ARN do BVDV no soro utilizou-se o teste de RT-PCR (*Real Time - Polymerase Chain Reaction*), técnica laboratorial de biologia molecular baseada na reação em cadeia da polimerase. O ARN total foi extraído a partir do soro usando o *kit* comercial de isolamento ‘MagVet™ Universal’ (LSI-*ThermoFisher*), de acordo com as instruções do fabricante. Foram adicionados 80 µL de tampão NM6 para eluir o ARN, utilizado o *kit* de triagem ‘LSI VetMAX™ BVDV Screening Real-Time PCR Kit, synthetic EPC’ (LSI-*ThermoFisher Scientific*) e equipamento ‘7500 Real-Time PCR System Applied Biosystems’. Esta técnica é baseada na detecção da região 5’-*untranslated* (5’ UTR) do genoma viral e do gene E2 do BVDV (Goyal *et al*, 2005).

Os animais com resultados positivos no método ELISA-Ac foram considerados virémicos e os que em simultâneo deram positivo com o método RT-PCR, considerados animais virémicos persistentes, designados vulgarmente como animais PI.

3.4 – Questionário epidemiológico

Os produtores de leite foram informados do objetivo do estudo por intermédio de um inquérito estruturado (Benevides, 2005) (anexo 3) com base numa entrevista direta ao produtor, realizada entre setembro e dezembro de 2015. O objetivo deste inquérito foi recolher informação sobre os principais comportamentos e fatores de risco, associados ao aparecimento do BVDV nas explorações, com destaque para as práticas de vacinação, estado de saúde do efetivo (problemas reprodutivos e respiratórios), introdução de animais na exploração, contato com outros animais da mesma espécie, bem como do manejo em geral.

3.5 – Análise dos dados

O primeiro objetivo do trabalho foi determinar a proporção de animais existentes nas explorações leiteiras da ilha das Flores e do Corvo, com níveis de anticorpos positivos contra o vírus BVD (seroprevalência) e a prevalência de explorações com animais seropositivos, determinando também a prevalência de animais PI neste grupo de ilhas. O segundo objetivo foi analisar a informação recolhida junto dos produtores por meio de questionário epidemiológico, para compreender os principais comportamentos e fatores de

risco, associados ao aparecimento do BVDV nas explorações. Com esta informação pretendeu-se avaliar a situação epidemiológica do BVDV nas duas ilhas do grupo ocidental do arquipélago dos Açores e investigar os fatores de risco que poderiam estar associados à infeção pelo vírus.

Os resultados serológicos foram analisados por exploração leiteira e pelo número de animais presentes nas explorações leiteiras amostradas, com recurso ao programa informático Microsoft EXCEL do Windows 10® e ao programa SPSS® (IBM Corp. Released 2013. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. Armonk, NY: IBM Corp.) para análise descritiva.

A percentagem de prevalência (P) de BVDV entre animais (ou seroprevalência) foi determinada para a população total estudada com a seguinte fórmula:

$$P_{animais} = \frac{n^{\circ} \text{ de bovinos seropositivos}}{n^{\circ} \text{ total de bovinos analisados}} \times 100$$

Onde o ‘nº de bovinos seropositivos’ corresponde aos bovinos em que o teste ELISA-Ac apresentou um resultado positivo ou duvidoso (níveis de anticorpos positivos no soro).

A prevalência foi expressa com intervalos de confiança (IC) de 95% segundo a fórmula:

$$P \pm Z \sqrt{\frac{p \cdot q}{n}}$$

Onde:

P = Prevalência

Z = 1,96 (95% de nível de confiança)

Q = 1 – P

n = dimensão da amostra

A percentagem de prevalência entre explorações leiteiras foi determinada ao considerar uma exploração positiva quando pelo menos existir um animal seropositivo e aplicou-se a seguinte fórmula:

$$P_{Explora\c{c}o\tilde{e}s} = \frac{N^{\circ} \text{ de explora\c{c}o\tilde{e}s leiteiras seropositivas}}{N^{\circ} \text{ de explora\c{c}o\tilde{e}s leiteiras estudadas}} \times 100$$

A percentagem de animais PI é dada pela seguinte fórmula:

$$P_{animais PI} = \frac{N^{\circ} \text{ de bovinos Seropositivos no teste ELISA-ac e no teste RT-PCR}}{N^{\circ} \text{ total de bovinos estudados}} \times 100$$

Onde o 'n° de bovinos seropositivos no teste ELISA-ac e no teste RT-PCR'corresponde aos bovinos em que o resultado do teste ELISA-ac foi positivo (animais virêmicos) e em simultâneo apresentaram um resultado positivo no teste RT-PCR, indicando presença de infecção ativa pelo BVDV (animais virêmicos persistentes).

4 – Resultados

4.1 - Colheita das amostras

Existem aproximadamente 7700 bovinos repartidos pelas ilhas das Flores e do Corvo, sendo que, 6624 animais dizem respeito à ilha das Flores (3060 do concelho das Lajes das Flores e 3564 do concelho de Santa Cruz das Flores) e 1073 à ilha do Corvo. Os dois concelhos da ilha das Flores compreendem 155 explorações bovinas das quais 24 são explorações leiteiras. O único concelho da ilha do Corvo compreende 50 explorações bovinas das quais 6 são explorações leiteiras. Todos os animais de todas as explorações leiteiras da ilha das Flores e da ilha do Corvo foram analisados durante os meses de setembro de 2015 a janeiro de 2016. Na tabela 5 estão discriminados os dados por concelho e freguesia.

Tabela 5: Número de animais e número de explorações existentes por freguesia na ilha das Flores e ilha do Corvo (Fonte: Ministério da Agricultura do Desenvolvimento Rural e das Pescas, agosto de 2016).

Ilha das Flores			
Concelho	Freguesia	N.º de Animais	N.º Explorações
Lajes das Flores	Fajãzinha	167	16
	Lomba	599	25
	Lajedo	703	25
	Lajes das Flores	632	38
	Mosteiro	226	6
	Fajã Grande	337	24
	Fazenda	396	21
	Sub-total	3060	155
Santa Cruz das Flores	Santa Cruz das	2000	98
	Caveira	218	12
	Cedros	247	20
	Ponta Delgada	1099	37
	Sub-total	3564	167
Total		6624	322
Ilha do Corvo			
Concelho	Freguesia	N.º de Animais	N.º Explorações
Vila Nova do Corvo	Vila Nova do Corvo	1073	50
	Total	1073	50

O estudo abrangeu no total 268 animais (251 da ilha das Flores e 17 da ilha do Corvo), correspondendo a um valor médio de 96,6% de fêmeas (IC 95% = [94,4; 98,5]) e 3,4% de machos (IC 95% = [1,5; 5,6]). Foram também estudados 36 vitelos provenientes das explorações leiteiras da ilha das Flores com idade média de 0,39 anos (IC 95% = [0,35; 0,44]) e correspondendo a 72,2% de fêmeas e 27,8% de machos. Na altura em que foi feito este estudo, nenhuma das explorações leiteiras da ilha do Corvo tinha vitelos para análise.

4.2 – Prevalência de explorações com níveis de anticorpos positivos do BVDV

A seroprevalência e prevalência de BVDV foi determinada em 30 explorações leiteiras, testando 251 bovinos de ilha das Flores e 17 de ilha do Corvo, de setembro de 2015 a janeiro de 2016.

Nas explorações estudadas com aptidão leiteira, verificou-se que a seroprevalência com níveis de anticorpos positivos ao BVDV em amostras de soro (seroprevalência de explorações) foi de 83,3% para a ilha das Flores (20 explorações positivas) e 100% para a ilha do Corvo.

Nas explorações estudadas com aptidão leiteira, verificou-se que a prevalência de animais com níveis de anticorpos positivos ao BVDV em amostras de soro (seroprevalência entre animais) foi de 36,8% para a ilha das Flores e 83,3% para a ilha do Corvo sendo a prevalência global para o grupo ocidental do arquipélago dos Açores de 49,3% (n=30) (tabela 6).

Tabela 6: Prevalência da infeção e percentagem de animais positivos na ilha das Flores e Corvo (\bar{x} = média percentual; IC 95% = intervalo de confiança de 95% para a média percentual) e prevalência global para o grupo ocidental do arquipélago dos Açores.

Explorações analisadas	Resultados Teste ELISA – ac						Seroprevalência (\bar{x} ; IC 95%)
	Positivo		Negativo		Duvidoso		
	N	%	n	%	N	%	
Flores (n=24)	118	36,8	125	59,6	8	3,6	36,8%; [30,7; 42,9]
Corvo (n=6)	14	83,3	3	16,7	0	0,0	83,3%; [75,0; 91,6]
Total (n _T =30)	132	49,3	128	47,8	8	2,9	49,3%

Determinou-se também a idade média dos bovinos em função dos resultados do teste ELISA-ac. A tabela 7 apresenta a distribuição dos resultados positivos, negativos e duvidosos de acordo com a idade média dos bovinos (em meses e em anos) e intervalo de confiança de 95% para a média.

Tabela 7: Distribuição dos resultados do teste ELISA-ac pela idade média dos bovinos analisados (em meses e anos).

Resultado do Teste ELISA-ac	Idade média dos bovinos (Meses; IC 95%)	Idade média dos bovinos (Anos; IC 95%)
Positivo	63,7; [58,1;70,4]	5,3; [4,8; 5,9]
Negativo	54,8; [49,6; 60,2]	4,6; [4,2; 5,1]
Duvidoso	77,1; [60,6; 92,7]	6,4; [5,1; 7,7]

Relativamente aos vitelos (idade igual ou inferior a 6 meses) não foi aplicado o teste sorológico ELISA-ac já que a presença de anticorpos maternos, adquiridos de forma passiva pela ingestão de colostro, poderia originar um resultado ‘falso-positivo’. Optou-se antes pela pesquisa do antígeno viral pela técnica de RT-PCR em amostras de sangue destes animais. De salientar que as explorações leiteiras da ilha do Corvo, não possuíam vitelos durante o período em que foi feita a recolha de amostras.

4.3 – Prevalência de explorações infetadas com BVDV

Todas as amostras soropositivas e soronegativas para anticorpos contra o BVDV foram sujeitas à pesquisa do antígeno viral pela técnica RT-PCR visando determinar a presença de animais PI.

Quer na ilha das Flores quer na ilha do Corvo não foram detetadas, nas explorações de aptidão leiteira, animais infetados (PI). De facto, todas as amostras de soro analisadas pela técnica RT-PCR para a pesquisa do ARN do BVDV foram negativas, sendo portanto, nula (0,0%) a prevalência global de animais persistentemente infetados com BVDV neste grupo de ilhas.

No que concerne aos 36 vitelos (provenientes exclusivamente da ilha das Flores), foi feita a pesquisa de antígeno nas amostras de sangue, não tendo sido detetados animais PI (resultado negativo para todos os animais).

4.4 – Questionário epidemiológico

4.4.1 – Estrutura da exploração

Todas as explorações analisadas responderam ao questionário epidemiológico. Na tabela 8 encontra-se a caracterização do efetivo presente nas explorações leiteiras das duas ilhas, expresso em número total (n), média (\bar{x}) e intervalo de confiança de 95% para a média (IC 95%).

Tabela 8: Caracterização do efetivo presente nas explorações leiteiras, no conjunto da ilha das Flores e do Corvo, aquando do questionário epidemiológico.

Variável	n (\bar{x} ; IC 95%)
N.º Vacas/tanque de leite	177 (6,5; [4,5; 8,9])
N.º Vacas em Produção	170 (6,5; [4,4; 8,8])
N.º Vacas Secas	54 (1,9; [0,8; 2,9])
N.º Novilhas 12-24 meses	20 (0,7; [0,2; 0,9])
N.º Vitelos <12 meses	37 (1,2; [0,6; 2,0])
N.º Touros	6 (0,2; [0,1; 0,3])
N.º Total de Cabeças de gado	304 (11,5; [9,5; 13,8])

4.4.2 – Contacto entre explorações e vulnerabilidade a vetores

Todas as explorações inquiridas possuem explorações em redor, com um valor médio de 11,5 explorações vizinhas para o total das duas ilhas (I.C 95% = [9,5; 13,8]), sendo o valor mínimo de 3 explorações vizinhas e um máximo de 20 explorações. Na ilha das Flores, em 20,3% das explorações analisadas existe contacto direto com outros animais; na ilha do Corvo esse valor é de 100%, sobretudo através de muros, bardos ⁽²⁾ e cercas que separam as parcelas das diversas explorações.

Na ilha das Flores, 12,5% das explorações utilizam o Baldio da Secretaria Regional da Agricultura e Floresta de junho a 15 de dezembro. Na ilha do Corvo todas as explorações colocam animais no Baldio de março a novembro verificando-se o contacto entre todos os animais de todas as explorações. No total das duas ilhas, a utilização de Baldios cifra-se em 30% das explorações.

⁽²⁾ O mesmo que tapume de sebes, ramos ou silvas.

De acordo com as respostas dos produtores, em 36,7% das explorações leiteiras verificou-se o contacto com animais de outras espécies, surgindo com maior frequência os pequenos ruminantes como ovinos e caprinos na ilha das Flores, e caprinos e canídeos na ilha do Corvo. Os resultados do questionário encontram-se no gráfico 1.

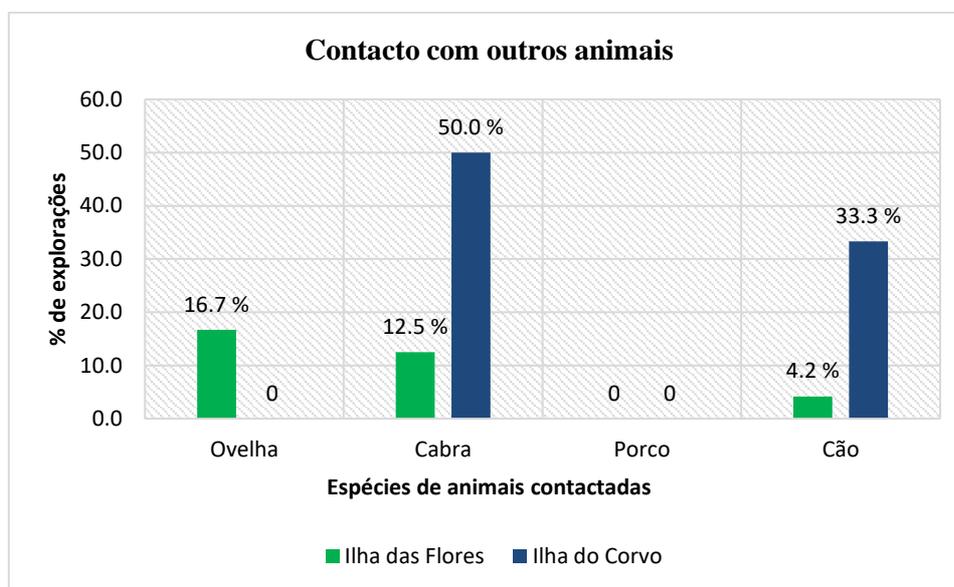


Gráfico 1: Percentagem de explorações em que houve contacto com outros animais – ovelhas, cabras, porcos e cães.

Nenhuma das explorações inquiridas fez referência à participação em feiras e/ou exposições nem tão pouco à realização de quarentena. A realização de testes serológicos para rastreio de doenças, que não as incluídas nas campanhas de saneamento obrigatório, não foi apontada. No entanto todos os produtores inquiridos deram indicação de verificação do boletim sanitário dos animais que entram na exploração.

Constatou-se que cerca de 93,3% das explorações inquiridas realizam exportação dos animais (91,7% das explorações da ilha das Flores e 100% das explorações da ilha do Corvo). No caso da ilha do Corvo os inquiridos indicaram que a exportação foi feita unicamente para a R.A.A. sendo este valor mais baixo (80,8%) no caso das explorações da ilha das Flores; 4,2% das explorações da ilha das Flores exportam para o continente português.

Apenas uma exploração leiteira (3,3%) deu a indicação de introdução de animais na exploração proveniente de outra ilha da Região Autónoma dos Açores (ilha de S. Miguel).

Em 36,7% das explorações, os animais foram introduzidos de outras explorações, feiras e Impérios⁽³⁾ da ilha (29,2% no caso da ilha das Flores e 66,7% no caso da ilha do Corvo).

A utilização de cobrição natural foi assinalada em 40,0% das explorações inquiridas, sendo que no caso da ilha do Corvo esse valor ascende a 100%. Neste caso os touros provêm da própria exploração. As restantes explorações recorrem à inseminação artificial sendo a origem do sémen exclusivo dos S.D.A.F.C. (Serviço de Desenvolvimento Agrário das Flores e Corvo).

4.4.3 – Maneio dos vitelos e novilhas

Em 43,3% (IC 95% = [26,7; 60,0]) das explorações inquiridas, os vitelos têm por norma beberem colostro da própria mãe durante aproximadamente 6 dias (\bar{x} = 6,3 dias) idade a partir da qual são separados da mãe e passam a beber leite da mãe (36,7%; IC 95% = [20,0; 53,3]) e de outras vacas (6,7%; IC 95% = [0,0; 16,7]). No caso da ilha do Corvo no momento em que se realizou o questionário, não existiam vitelos nem novilhas.

Na totalidade das explorações da ilha das Flores, verificou-se que os vitelos são criados nas pastagens pelos próprios produtores sendo que 58,7% (IC 95% = [40,0; 73,3]) das explorações tem os animais presos por corrente com estaca.

Os machos são vendidos à nascença em 43,3% das explorações (IC 95% = [26,7; 63,3]) e em 13,3% (IC 95% = [3,3; 26,7]) são criados para serem vendidos mais tarde. Em 16,7% (IC 95% = [3,3; 30,0]) das explorações as fêmeas são para substituição (ficam na exploração), 13,3% (IC 95% = [3,3; 26,7]) são para venda ao nascer, 6,7% (IC 95% = [0,0;16,7]) para criação e venda, e 6,7% (IC 95% = [0,0;16,7]) são só para venda.

⁽³⁾ Império ou Império do Divino Espírito Santo - pequeno edifício, templo ou capela com um altar do Espírito Santo; local de agregação da Irmandade do Divino Espírito Santo (*irmãos*, associação de vizinhos, famílias residentes numa mesma freguesia ou localidade, voluntariamente inscritos e consensualmente aceites, com iguais direitos e deveres) e onde entre o domingo de Páscoa e os domingos de Pentecostes ou da Trindade, se venera o Espírito Santo. Durante as festas do Divino Espírito Santo, realiza-se a “coroação” do Imperador Menino, a “procissão dos vitelos”, o desfile de cortejos e o bodo de pão e de carne. Ao império está normalmente associada uma *dispensa*, *copa* ou *talho* onde se guardam os bens que serão distribuídos pela comunidade local nestes dias da festa: geralmente são diferentes tipos de pão, as sopas do Espírito Santo (pão e carne de vaca) e a alcatra.

4.4.4 – Práticas vacinais

Em nenhuma das explorações inquiridas (ilha das Flores e ilha do Corvo) existiam programas vacinais em curso nem tão pouco os animais dessas explorações tinham sofrido qualquer tipo de imunização.

4.4.5 – Principais problemas sanitários nas explorações

Os principais problemas observados nas explorações leiteiras foram abortos, mamites, pústulas nas mucosas, retenção placentária, diarreia, retorno do cio, mortalidade embrionária, corrimento nasal e partos difíceis. Os valores percentuais estão indicados no gráfico 2.

Na ilha das Flores os principais problemas sanitários observados foram: diarreia (54,2%), mamites (45,8%) e abortos (37,5%). Observou-se também um problema reprodutivo (que pode ter origem infecciosa): retorno do cio (58,3% das explorações). Na ilha do Corvo foram essencialmente diarreia (66,7% das explorações) bem como retorno do cio (66,7% das explorações).

Nos vitelos (ilha das Flores) os problemas referidos foram: anorexia, diarreia e diarreia fatal, todos na mesma exploração leiteira.

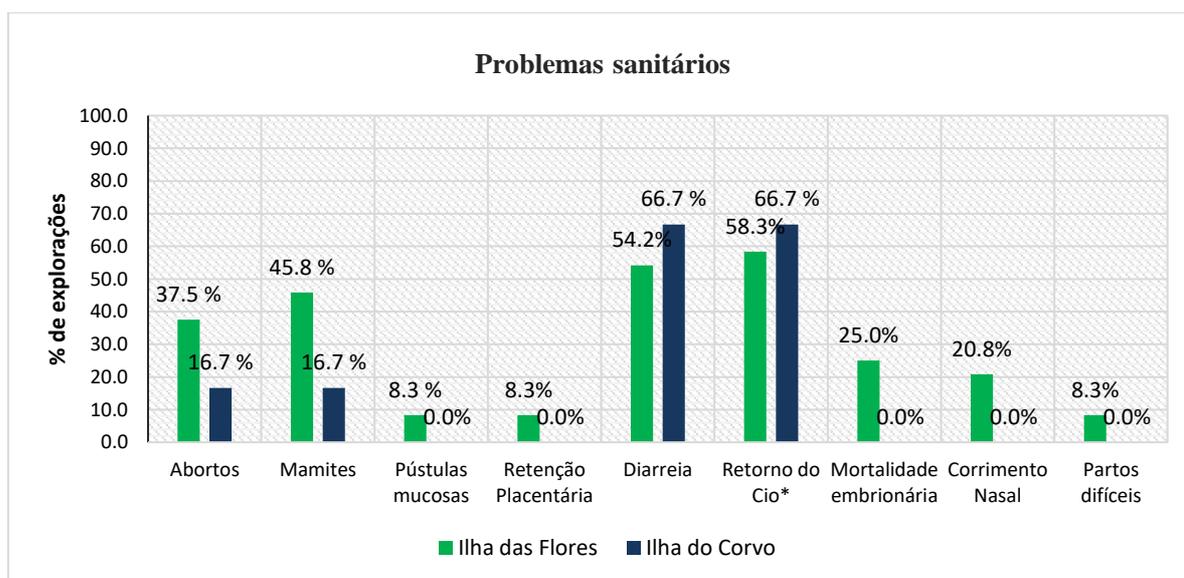


Gráfico 2: Distribuição percentual dos principais problemas sanitários relatados pelos produtores nas explorações estudadas.* Retorno do Cio – problema reprodutivo.

5 – Discussão

Todas as explorações leiteiras das ilhas do grupo ocidental da R.A.A. foram estudadas, pelo que se trata de uma análise da totalidade de observações individuais da ilha das Flores e da ilha do Corvo, permitindo não apenas inferir, mas avaliar com exactidão o que se passa atualmente no que concerne aos aspetos epidemiológicos da BVD.

Este estudo epidemiológico permitiu determinar a seroprevalência para o BVDV de 36,8% para a ilha das Flores e de 83,3% para ilha do Corvo e prevalência de explorações de 83,3% e 100% respectivamente para ilha das Flores e para a ilha do Corvo.

A presença de antigénio viral não foi detetada em nenhuma das amostras analisadas, pelo que a prevalência global de animais persistentemente infetados (PI) foi de 0%.

De acordo com um estudo realizado por Rocha (2009) onde foram analisadas amostras de sangue de todos os bovinos com mais de doze meses na ilha das Flores e do Corvo, a seroprevalência de animais foi de 43,2% para a ilha das Flores e 74,6% para a ilha do Corvo e a prevalência de explorações de 84,4% e 100% % respectivamente para ilha das Flores e para a ilha do Corvo. Esta autora determinou ainda uma prevalência global de animais infetados com BVDV de 0,2%.

Pinto *et al.* (2004) efectuou análises serológicas em 29 explorações da ilha de S. Miguel estimando uma prevalência de BVDV em explorações de 100% e uma proporção de animais seropositivos de 60%.

Benevides (2005) estimou, num estudo epidemiológico transversal realizado em explorações leiteiras da ilha Terceira, uma prevalência de explorações com níveis de anticorpos positivos no leite de conjunto de 97% e prevalência de animais infetados com BVDV de 0,4%.

De acordo com dados da D.R.D.A. (2008) existe uma elevada prevalência de animais positivos na R.A.A.: 57,5% no total das 9 ilhas com 63,9% em S. Miguel; 84,2% das explorações desta região são positivas com valores de 97,9% só na ilha de S. Miguel.

Niza-Ribeiro *et al.* (2004) realizaram uma pesquisa de anticorpos em 6682 amostras de soro bovino, nos concelhos de Póvoa de Varzim e Ponte de Lima (Portugal) tendo obtido resultado positivo em 63,3% das amostras; foi feita a pesquisa de antigénio a 8549 amostras tendo sido detetados 58 animais PI e 4 animais com virémia transitória.

Canário (2009) determinou a seroprevalência do BVDV em 20 explorações de bovinos de carne em regime de exploração extensiva, sem programa vacinal contra a doença,

distribuídas pela região do Alentejo, através da pesquisa de anticorpos anti-BVDV cifrando-se em 35,1% a seroprevalência de animais e em 65% a prevalência de explorações.

Já em países europeus, nomeadamente os países nórdicos, apresentam valores de prevalência mais baixos: a pesquisa de anticorpos em tanques de leite revelou 39%, 9% e 1% de explorações positivas respectivamente na Dinamarca, Noruega e Finlândia (Bitsch & Rønsholt, 1995).

Relativamente à prevalência de bovinos PI, foram estimados valores de 0,8% (Reino Unido), 0,75% (Bélgica), 0,9% (Alemanha e Polónia) e 0,6% (Irlanda) (O'Neill *et al.*, 2009). Na Suíça e após a implementação de um programa nacional de erradicação do BVDV, foi possível reduzir os valores de prevalência de animais PI para 0,2% (Presi *et al.*, 2011). Na Hungria, Szabára *et al.*, (2016) efetuou um estudo sobre a prevalência entre 2008 e 2012 a cerca de 75% da população de bovinos do país e demonstrou que a prevalência do BVDV nas explorações foi de 12,4% e a prevalência individual de 7,2%. Na Itália, Ferrari *et al.* (1999) determinou uma seroprevalência dos animais de 33% e uma prevalência de explorações infectadas de 8,8%. Na Grécia, Billinis *et al.* (2005) estimou valores médios de prevalência de 14% e de prevalência de animais PI de 1,3%.

Fora da Europa os valores de prevalência da exploração podem rondar os 100% como é o caso do Chile com valores de 81% (Reinhardt *et al.*, 1990). Na Argentina, Uruguai, Venezuela, Colômbia, Peru, Equador e México, a prevalência de infeção pelo BVDV nos bovinos variou entre 6,3% a 74% e de 16% a 100% nas explorações (Silva, 2014). Num estudo recente realizado no estado de São Paulo, Brasil, foram amostradas 1732 explorações e determinada uma prevalência em fêmeas de 47,08% e uma prevalência de exploração de 78,21% (Silva, 2014). Já em 2010, Chaves *et al.*, analisaram 400 amostras de soro de fêmeas de 40 explorações da região amazónica maranhense (Brasil) e concluíram que a prevalência nos animais foi de 61,5% sendo a prevalência de exploração de 95,0%. Na Jordânia foram encontrados valores de prevalência individual de 31,6% e de prevalência de exploração de 80,7% (Talafha *et al.*, 2009)

Os resultados obtidos no presente estudo estão dentro da gama de variação de resultados encontrados na literatura, tanto para a percentagem de explorações com níveis de anticorpos positivos do BVDV como para a seroprevalência de animais.

No entanto não deixam de ser preocupantes, principalmente no que diz respeito à ilha do Corvo, uma vez que evidenciam uma elevada exposição ao agente infeccioso. Estes valores elevados sugerem que existe uma evidente circulação viral nestas explorações e que

as formas de transmissão do mesmo estão facilitadas, aumentando o risco de existência de animais PI.

Os animais PI desempenham um papel crucial na manutenção do vírus na população visto que estes não podem ser imunizados e originam sempre uma descendência PI. Além disso ao serem comercializados, representam um risco acrescido para as explorações. Percentagens bastante elevadas de anticorpos (acima de 60%) nas explorações pode sugerir que existe um ou mais animais PI. Está bem estabelecido que apenas a presença de animais PI pode conduzir a uma alta prevalência de seropositivos, já que o contágio a partir de animais que fazem virémia temporária é relativamente baixo (Houe, 1995; Wittum *et al.*, 2001; Campbell, 2004).

A literatura aponta, para uma prevalência de animais PI entre 0,5% e 2% (Houe, 1999), contudo no presente estudo não foi encontrado nenhum animal PI.

Muitas vezes os animais PI não são identificados ou o seu número é subvalorizado porque:

- I. Existe a prática de abate de bovinos com menos de 1 ano de idade, subsidiado pelo Governo Regional dos Açores;
- II. Ocorrem abortos ou mortes após o nascimento não chegando à fase juvenil ou adulta;
- III. A grande maioria dos vitelos machos é abatida ou vendida para engorda, não permanecendo nas explorações leiteiras de origem.

Duffell & Harkness (1985) constataram que a prevalência de animais PI é maior quanto mais perto se está do nascimento e depois essa prevalência tende a diminuir com o aumento da idade. Mais de 50% dos animais PI morre ou são abatidos por questões de saúde no primeiro ano de vida. Associados a estas mortes estão quadros clínicos de pneumonia, mas mais frequentemente de diarreia envolvendo, por vezes outros agentes infecciosos.

No presente estudo optou-se por analisar paralelamente o sangue dos vitelos para pesquisa de antigénio uma vez que na população desta idade, a interferência dos anticorpos colostrais nos testes sorológicos pode dificultar a deteção de animais PI. Mas, mais uma vez, não foram encontrados animais PI neste conjunto de ilhas da R.A.A.

O questionário epidemiológico efetuado junto dos produtores das explorações pretendeu recolher informação sobre os principais comportamentos e fatores de risco, associados ao aparecimento do BVDV nas explorações, com destaque para as práticas de vacinação, estado de saúde do efetivo (problemas reprodutivos e respiratórios), introdução de animais na exploração, contacto com outros animais da mesma espécie, bem como do manejo em geral.

Os resultados permitem verificar que estão presentes nestas duas ilhas diversos fatores de risco. O sistema de manejo vigente nas explorações leiteiras destas duas ilhas pode favorecer o aumento do número de animais positivos ao BVDV uma vez que facilita a dispersão do vírus.

Vários autores apontam como principais fatores de risco para a entrada do BVDV nas explorações, o contacto com bovinos de outras explorações (Wittum *et al.*, 2000; Campbell, 2004), a cobrição natural com touro infectado ou sémen proveniente de um touro infectado (Fray, Paton & Alenius, 2000), a entrada de pessoas e/ou veículos, a introdução de animais, o contacto com ovinos, caprinos, pequenos ruminantes (Carlsson & Belák, 1994; Pescador *et al.*, 2004) e suínos (Evermann & Barrington, 2005).

Todas as explorações da ilha das Flores e do Corvo possuem explorações em redor e embora possam estar delimitadas fisicamente, essa barreira é insuficiente para impedir o contacto dos bovinos de explorações diferentes. No caso da ilha das Flores, 20,3% das explorações têm contacto direto com outros animais de outras explorações, valor esse que sobe para 100% no caso da ilha do Corvo. O contacto é feito através de muros, bardos e cercas.

O regime de pastoreio rotativo, que ocorre nos Baldios (pasto comunitário) da ilha das Flores e da ilha do Corvo, fomenta o contacto directo entre animais de diferentes explorações. Na ilha das Flores só 12,5% das explorações leiteiras inquiridas, deram indicação de utilização de Baldios enquanto na ilha do Corvo todas as explorações recorrem ao único Baldio existente na ilha. Possivelmente este é um dos principais factores de risco pois promove a mistura de animais das diferentes explorações. Estudos epidemiológicos mostram ainda que o BVDV dispersa-se melhor em áreas com maior densidade animal e que, por isso, a seroprevalência do vírus nessas áreas pode estar aumentada. No estudo realizado por Rocha (2009), 39,65% das explorações da ilha das Flores utilizam o Baldio de junho a dezembro, sendo esse valor de 100% para a ilha do Corvo. Estas práticas de manejo podem favorecer o aumento do número de animais positivos ao BVDV.

Os animais de outras espécies que surgiram com maior frequência nas explorações inquiridas foram respectivamente para a ilha das Flores e ilha do Corvo de: 16,7% de ovinos, 12,5% caprinos, 4,2% de canídeos e de 50,0% de caprinos, 33,3% de canídeos.

Rocha (2009) num estudo semelhante, constatou que na ilha das Flores, os caprinos surgiram em 22,8% das explorações e os ovinos em 48,1% das explorações; na ilha do Corvo foram os suínos que surgiram com maior frequência, nomeadamente em 50,0% das explorações. Num estudo efectuado na ilha Terceira, Benevides (2005) constatou que 64,7% das explorações inquiridas possuíam cães nas explorações, revelando ser um fator de risco importante para a entrada do *Neospora caninum*, protozoário responsável por afetar bovinos, canídeos e, esporadicamente, caprinos, ovinos e equinos. Pacheco (2010) num estudo realizado em 64 explorações leiteiras distribuídas por vários distritos de Portugal continental determinou em 77,2% das explorações a existência de contacto dos bovinos principalmente com cães (77,3%), ovelhas (9,1%), cabras (4,6%) e porcos (2,3%).

Investigações soroepidemiológicas realizadas por Hyera *et al.* (1991), revelaram uma prevalência generalizada de anticorpos neutralizantes contra o vírus BVD, não só em bovinos mas também em ovinos e caprinos, revelando assim a importância destes animais como possível fonte de infeção para bovinos.

A introdução de animais na exploração sem realização de testes serológicos para rastreio de doenças, que não as incluídas nas campanhas de saneamento obrigatório e a não realização de quarentena, são outras práticas de risco, presentes nas explorações da ilha das Flores e do Corvo. A totalidade das explorações inquiridas não realizou nenhuma destas práticas, contudo, todos os produtores deram a indicação de verificação do boletim sanitário dos animais que entraram nas suas explorações. Estas situações já tinham sido relatadas por Rocha (2009) tendo-se verificado uma evolução no comportamento dos produtores uma vez que em 2009 os resultados obtidos indicavam que os produtores não verificavam o boletim sanitário. Já Benevides (2005) registou que cerca de 61,6% dos produtores não faziam a verificação do boletim sanitário. Ribeiro & Pereira (2004) deram indicação que apenas 36% das explorações efetuavam quarentena, 55% faziam a verificação dos boletins sanitários e 36% efetuavam os testes serológicos aos animais adquiridos. Esta questão é importante no desenho de um programa de biossegurança, pois é necessário conhecer as condições da unidade de produção nomeadamente no que diz respeito à entrada de novos animais com conhecimento dos registos sanitários e realização de quarentena.

O principal método de cobertura verificado foi a monta natural (100% das explorações inquiridas da ilha do Corvo e 50,0% das explorações da ilha das Flores, prefazendo um total de 40% das explorações leiteiras), sendo que os touros de cobertura provieram da própria exploração. No estudo de Rocha (2009) a utilização de monta natural foi assinalada também em 100% das explorações da ilha do Corvo (não sendo exclusiva); na ilha das Flores apenas 0,6% das explorações indicou recorrer exclusivamente à inseminação artificial efetuada pelos técnicos do S.D.A.F.C.. A mesma autora indicou que durante o ano de 2007, 23,7% das explorações da ilha das Flores recorreram à inseminação artificial e na ilha do Corvo, 36% das explorações.

Ribeiro & Pereira (2004) indicaram que das 44 explorações infectadas do seu estudo (região do Entre Douro e Minho), a utilização da cobertura natural foi registada em 5 e simultaneamente com o recurso à inseminação artificial; a utilização de um touro próprio e/ou de outra exploração ocorreu de forma esporádica e em situações muito específicas (nalgumas novilhas e na sequência de inseminações falhadas).

A utilização de touros infetados como reprodutores pode ser considerado um fator de risco dependendo da eliminação ou não do vírus no sémen no momento de monta e do número de fêmeas cobertas. De acordo com Meyling & Jensen (1988), a taxa de infeção pode ser de 100% no caso de touros PI decrescendo esse valor no caso de touros com infeção aguda (Kirkland *et al.*, 1991). Na Polónia, foram confirmados 2 touros PI em 219 (0,9%) e em Itália foram identificados 22 (1,04%) touros PI em 2112, num recrutamento para um centro de inseminação (Ferrari *et al.*, 1999; Polak & Zmudzisky, 1999), demonstrando o risco de infeção que acarreta.

Constatou-se que nenhuma das explorações deste estudo participou em concursos e/ou feiras. O mesmo já tinha sido evidenciado por Rocha (2009) para estas duas ilhas e por Ribeiro & Pereira (2004) na região de Entre Douro e Minho. De facto, este é um fator de risco significativo para o BVDV tal como demonstrado por Pacheco (2010): verificou-se que em 11,1% das explorações estudadas, houve participação dos animais em exposições, feiras; estas explorações estavam 2,3 vezes mais em risco de serem positivas ao BVDV do que as explorações que não levam os seus animais a participar em tais eventos.

No presente estudo mais de 90% das explorações analisadas, exportam os seus animais principalmente para a R.A.A., sendo que menos de 5% das explorações leiteiras da ilha das Flores o fazem para o continente português. Apenas uma exploração importou

animais da R.A.A. (ilha de São Miguel). A introdução de animais de outras explorações, feiras ou Impérios de ilha é diminuta na ilha das Flores (29,2%) sendo no entanto mais significativa (66,7%) no caso da ilha do Corvo.

No estudo realizado por Rocha (2009) apenas duas explorações importaram bovinos provenientes da R.A.A. (Faial e Pico). Contudo, não foi possível em nenhuma das situações, verificar se essa introdução poderá ter contribuído para a prevalência do BVDV nas explorações.

Em nenhuma das explorações inquiridas (ilha das Flores e ilha do Corvo) existiam programas vacinais em curso nem tão pouco os animais dessas explorações tinham sofrido qualquer tipo de imunização. Benevides (2005) determinou no estudo realizado na ilha Terceira, que apenas 10% das explorações estudadas possuíam programas vacinais, sendo a ‘Triangle®9’⁽⁴⁾ a vacina mais utilizada (53,2%) seguida da ‘Hiprabovis®4’⁽⁵⁾ (25,3%). Segundo os produtores dessa ilha, a iniciativa da vacinação coube ao médico veterinário em 81% das explorações com programas vacinais. Das explorações que vacinam, em 59,5% a vacinação estendeu-se a todo o efetivo, em 16,5% às novilhas e vacas, em 15,2% apenas as vacas e em 8,8% aos vitelos e vacas.

Os principais problemas sanitários encontrados nas duas ilhas em estudo foram diarreias, mastites e abortos. Foi também encontrado um outro problema – retorno do cio – que, embora não seja um problema sanitário mas sim reprodutivo, pode ter origem infecciosa. Registaram-se ainda nas explorações leiteiras da ilha das Flores com valores percentuais mais baixos: mortalidade embrionária, corrimento nasal, partos difíceis, pústulas das mucosas e retenção placentária.

Benevides (2005) apontou como sendo os principais problemas observados nas explorações leiteiras da ilha da Terceira a mortalidade embrionária (64%), abortos (45,7%), mamites (23,7%), partos difíceis (27,1%), diarreias (19,2%) e broncopneumonias (14,5%).

Estes resultados também estão de acordo com o que Pimentel (2011) observou em diversas explorações de S. Miguel onde o BVDV estava presente e onde não estavam a ser tomadas quaisquer medidas para o controlo do mesmo: diarreia, aborto e mucosa vaginal com pústulas. Após uma pesquisa mais aprofundada a autora concluiu que os abortos vinham de explorações com historial de abortos, vacas que repetiam cio e morte embrionária. Contudo,

⁽⁴⁾ Triangle® 9+PH+K: Indicado para a vacinação de gado saudável na prevenção de doenças causadas por rinotraqueíte bovina infecciosa (IBR), diarreia viral bovina (BVD) Tipo I, parainfluenza-3 bovina (PI-3), vírus sincicial respiratório bovino (BRSV), *Mannheimia haemolytica*, *Leptospira canicola*, *L. grippityphosa*, *L. hardjo*, *L. icterohaemorrhagiae* e *L. pomona*.

⁽⁵⁾ Hiprabovis® 4: indicado para a vacinação de gado adulto na prevenção da rinotraqueíte bovina infecciosa (IBR), vulvovaginite pustular infecciosa (IPV) e doença das mucosas ou da diarreia viral bovina (BVD); indicado também para a prevenção da rinotraqueíte bovina infecciosa (IBR), parainfluenza-3 bovina (PI-3), doença das mucosas ou da diarreia viral bovina (BVD) e vírus sincicial respiratório bovino nos bezerros.

em nenhum destes animais é possível afirmar com certeza que é o BVDV responsável pelo quadro clínico.

No presente estudo os problemas referidos nos vitelos foram: anorexia, diarreia e diarreia fatal, todos na mesma exploração leiteira (ilha das Flores). Benevides (2005) também faz referência no seu estudo (ilha Terceira) a diarreias, broncopneumonias e morte sem causa aparente como os problemas mais frequentes em vitelos. De acordo com a literatura consultada estes sintomas revelam tratar-se de infecções secundárias relacionadas com o vírus e que incluem diarreia, pneumonia, diminuição da produção, patologia reprodutiva, aumento da incidência de outras doenças e a morte (Baker, 1990). O BVDV ataca a medula óssea, tecido linfóide, plaquetas e epitélio digestivo; os vitelos afetados apresentam normalmente úlceras orais, mais ao nível dos palatos mole e duro. Algumas variantes do vírus provocam enterite aguda com hemorragia intestinal, petéquias e equimoses, incluindo leucopenia e trombocitopenia (Smith, 2009).

6 - Conclusões

Pretendeu-se com este estudo avaliar a situação da BVD na população bovina leiteira das duas ilhas que integram o grupo ocidental do Arquipélago dos Açores – ilha das Flores e ilha do Corvo – dada o ‘peso’ que têm principalmente no setor agrícola local.

Apesar das evidências veterinárias de que o BVDV é importante sob várias perspectivas – como seja a produção, o bem-estar animal e a estabilidade dos preços de mercado –, a verdade é que a maioria dos produtores pouco ou nada faz para o controlar. A realidade é que as doenças endémicas são ‘cotadas’ com pouca importância na listagem de prioridades da gestão de uma exploração e da alocação de despesas (como sejam a alimentação ou o trabalho) devido à natureza pouco previsível da doença.

Não há nenhum tratamento eficaz para a infeção por BVDV, verificando-se muitas vezes, casos subclínicos e auto-limitantes. A prevenção e controlo é a forma mais eficaz de erradicar e impedir a reinfeção nas explorações. Os programas de controlo englobam medidas de biossegurança e de vigilância estritas, com identificação e eliminação de animais PI podendo adicionalmente efetuar-se vacinação, fornecendo assim algum grau de imunidade aos animais.

A avaliação do que se passa actualmente nas explorações leiteiras da ilha das Flores e da ilha do Corvo só poderia ser feita analisando os resultados da prevalência do BVDV nos animais e nas explorações.

Quando estudamos a prevalência de uma doença, como seja a BVD, não temos geralmente em conta a duração da doença, ou seja, não estamos a determinar quando é que a doença se desenvolveu, mas sim a avaliar o que se passa no momento da análise. Assim, o numerador da prevalência contém uma mistura de bovinos com diferentes durações da doença e, como consequência disto, não temos uma medida de risco. No entanto a prevalência é uma medida fundamental para quantificar a presença da doença na população de bovinos leiteiros. Isto poderá ajudar-nos a determinar os recursos necessários para a elaboração dum plano de erradicação.

A prevenção da doença pode envolver o uso de vacinas e/ou a análise e manejo dos factores de risco, assentando este último na identificação dos factores presentes e no seu controlo ou na diminuição do seu impacto na exploração, em grande medida através da implementação de medidas de biossegurança. O questionário epidemiológico surge neste

contexto, permitindo obter uma ferramenta de avaliação do risco de introdução, manutenção e disseminação do BVDV bem como avaliar práticas de biossegurança presentes nas referidas explorações.

Os resultados obtidos, ainda que preliminares devido ao reduzido número de explorações existentes nas duas ilhas e à sua expressão temporal, sugerem uma reduzida preocupação relativamente à presença e circulação do vírus. No entanto face à elevada taxa de explorações e de animais afetados (seropositivos) nomeadamente na ilha do Corvo, conclui-se haver necessidade de alterações de índole zootécnica e veterinária que passam pela avaliação do desempenho da produção dos rebanhos através do controlo produtivo (*e.g.* produção média diária por vaca em lactação, produção de leite por vaca na lactação, duração da lactação, percentagem de vacas em lactação, período seco), do controlo reprodutivo (*e.g.* taxa de prenhez, taxa de natalidade, intervalo entre partos) e do controlo sanitário (*e.g.* avaliação de doenças reprodutivas específicas tais como a brucelose, leptospirose, rinotraqueite infecciosa bovina, tricomoníase, ocorrências de abortos, controlo com recurso à vacinação).

Como o animal PI é o elemento chave da manutenção do BVDV numa exploração, todos os programas de controlo são altamente dependentes da deteção e eliminação desses portadores do vírus. Neste estudo, porém, não foram encontrados animais PI nas explorações leiteiras.

Seria importante rastrear o BVDV nas explorações de carne, as quais representam a maioria das explorações nestas duas ilhas. Sendo assim deverá dar-se ênfase às medidas preventivas de biossegurança integradas na gestão da exploração levando sempre em consideração as características do vírus (e da exploração), a fase de criação, a idade, os níveis de *stress*, o histórico e inclusive a regulamentação governamental.

Bibliografia

Aduriz, G.; Atxaerandio, R.; Cortabarria, N.. (2015). First detection of bovine viral diarrhoea virus type 2 en cattle in Spain. *Veterinary Rec. Open Access.*, vol.2 (1). *In:* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4567162/>. Acedido em 4 de Maio de 2016.

Agerholm, Jørgen S.; Hewicker-Trautwein, Marion; Peperkamp, Klaas and Windsor, Peter A.. (2015). Virus-induced congenital malformations in cattle. *Acta Veterinaria Scandinavica*; **57**:54.

AHVLA (Animal Health and Veterinary Laboratories Agency) – Scanning Surveillance Alert Notice. (2014). Outbreaks in Germany and Netherlands. *In:* <http://ahvla.defra.gov.uk/documents/surveillance/diseases/pub-bvd-outbreak.pdf>. Acedido em 4 de Maio de 2016.

Ames, T. L.. (1986). The causative agent of BVD, its epidemiology and pathogenesis. *Veterinary Medicine*, v. 81, p. 848-869.

Andrews, A.H.; Blowey, R.W.; Boyd, H.; Eddy, R.G.. *Bovine Medicine: Diseases and Husbandry of Cattle*. 2ª ed. Oxford, UK: Blackwell Science Ltd, (2004): 853-857. *In:* <http://vet.uokufa.edu.iq/staff/nabeelahmed/resarches/Bovine%20Medicine%20Diseases%20and%20Husbandry%20of%20Cattle.pdf>. Acedido em 9 de Maio de 2016.

Astiz, S.. (2013). Brotes de infección por BVDV tipo 2 en Alemania obligan a la reflexión sobre las campañas de erradicación y control de esta enfermedad. *Producción animal*; **28**: 30-37.

Baker, J.C.. (1987). Bovine viral diarrhea: a review. *J.Am.Vet. Med. Assoc.* **190**: 1449-1458.

Baker, J. (1990). Clinical aspects of bovine virus diarrhea virus infection. *Rev.Sci.Tech.Off Int. Epiz.*; **9**:25-41. *In:* <http://www.oie.int/doc/ged/D8241.PDF>. Acedido em 16 de Junho de 2016.

Baker, J.C. (1995). The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea infection. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 11(3): 425-445.

Baker, J. C. & Houe, H. (1995). Bovine Viral Diarrhoea Virus. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 22 (3):393-651.

Barber, D.M.L.; Nettleton, P.F.; Herring, J.A. (1985). Disease in a dairy herd associated with the introduction and spread of bovine virus diarrhoea virus. *Vet Rec.*; 117:459–464.

Barrett, D.J.; More, S.J.; Graham, D.A.; O’Flaherty, J.; Doherty, M.L.; Gunn, H.M. (2011). Considerations on BVD eradication for the Irish livestock industry. *Irish Veterinary Journal*, 64:12.

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

Baule, C., Kulcsár, G., Belák, K., Albert, M., Mittelholzer, C., Soós, T., Kucsera, L.; Belák, S. (2001). Pathogenesis of Primary Respiratory Disease Induced by Isolates from a New Genetic Cluster of Bovine Viral Diarrhoea Virus Type I. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(1), 146–153.

Bauermann, F.V.; Ridpath, J.F.; Weiblen, R.; Flores, E.F. (2013). HoBi-like viruses: an emerging group of pestiviruses. *J. Vet. Diagn. Invest.*; 25(1):6-15.

Bayne, Jenna E.; Walz, Paul H.; Passler, Thomas; White, Brad J.; Theurer, Miles E.; Van Santen, Edzard. (2016). Use of three-dimensional accelerometers to evaluate behavioral changes in cattle experimentally infected with bovine viral diarrhoea virus. *Am. J. Vet. Res.*; Vol. 77(6): 589-596.

Belák, S. & Ballagi-Pordány, A. (1991). Bovine viral diarrhoea virus infection: rapid diagnosis by the polymerase chain reaction. *Arch. Virol. Suppl*; 3: 181-190.

Benevides, S. (2005). Aspectos da epidemiologia da infecção do vírus da diarreia viral bovina, do vírus herpes bovino 1, do *Neospora caninum* e sua importância na eficiência reprodutiva em explorações leiteira da ilha Terceira. Tese apresentada ao Departamento de Ciências Agrárias da Universidade dos Açores para obtenção do grau de Mestre em Produção Animal, orientada pelo Dr. João Niza Ribeiro, Angra do Heroísmo.

Benevides, Sandra E.A.A; Flor, Lúcia M.G.; Martins, Hernani C.D.; Sellal, Eric; Daly, Stéphane; Colin, Stephanie. (2015). Phylogenetic analysis of Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) isolates from Azores. Rev. Port. Ciên. Vet. 110 (595-596):181-187. In: http://www.fmv.ulisboa.pt/spcv/PDF/pdf12_2015/181-187.pdf. Acedido em 23 de Maio de 2016.

Bielefeldt-Ohmann, H.(1984). An oculo-cerebellar syndrome caused by congenital bovine viral diarrhoea virus infection. Acta Vet Scand.; 25:36–49.

Binkhorst, G.J., Journée, D.L.H., Wouda, W., Straver, P.J., Vos, J.H.. (1983). Neurological disorders, virus persistence and hypomyelination in calves due to intra-uterine infections with bovine virus diarrhoea virus. I. Clinical symptoms and morphological lesions. Vet Q.; 5:145–155.

Bielanski, A.; Loewen, K.S.; Del Campo, M.R.; Sirard, M.A.; Willadsen, S.. (1993). Isolation of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) and bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in association with the in vitro production of bovine embryos. Theriogenology. 40(3):531-538.

Billinis, C.; Leontides, L.; Amiridis, G.S.; Spyrou, V.; Kostoulas, P.; Sofia, M.. (2005). Prevalence of BVDV infection in Greek dairy herds. Prev Vet Med.;72(1-2):75-79.

Bitsch, V. & Rønsholt, L. (1995). Control of bovine viral diarrhoea virus infection without vaccines. Vet Clin North Am Food Anim Pract. Nov;11(3):627-640.

Blanchard, P.C.; Ridpath, J.F.; Walker, J.B.; Hietala, S.K.. (2010). An outbreak of late-term abortions, premature births, and congenital deformities associated with a bovine viral

diarrhea virus 1 subtype b that induces thrombocytopenia. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 22 (1), pp. 128-131.

Bolin, S. R.; Littledike, E. T. & Ridpath, J. F.. (1991). Serologic detection and practical consequences of antigenic diversity among bovine viral diarrhea viruses in a vaccinated herd. *American Journal of Veterinary Research*, 52(7), 1033-1037.

Bolin, S.R.. (1995a). The pathogenesis of mucosal disease. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 11(3): 489-500.

Bolin, S.R.. (1995b). Control of bovine viral diarrhea infection by use of vaccination. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.* 11(3):615–625.

Bolin, S.R. & Grooms, D.L. (2004). Origination and consequences of bovine viral diarrhea virus diversity. *Vet. Clin. North Am., Food Anim. Pract.* 20:51-68.

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

Brock, K.V.. (2004). Strategies for the control and prevention of bovine viral diarrhea virus. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 20:171-180.

Brock, K.V. & Chase, C.C.. (2000). Development of a fetal challenge method for the evaluation of bovine viral diarrhea virus vaccines. *Vet Microbiol.*; 77(1-2): 209-214.

Brock, K.V. & Cortese, V.S.. (2001). Experimental fetal challenge using type II bovine viral diarrhea virus in cattle vaccinated with modified-live virus vaccine. *Vet Ther.*; 2(4):354-360.

Brock, K.V.; Grooms, D.L.; Givens, M.D.. (2005). Reproductive Disease and Persistent Infections. In: Goyal SM, Ridpath JF. *Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis, Management and Control*. 1^a ed. Oxford, UK: Blackwell Publishing, pp:145-156.

Brock, K.V.; McCarty, K.; Chase, C.C.; Harland, R.. (2006). Protection against fetal infection with either bovine viral diarrhoea virus type 1 or type 2 using a noncytopathic type 1 modified-live virus vaccine. *Vet. Ther.*;7(1):27-34.

Brodersen, B.W. & Kelling, C.L.. (1998). Effect of concurrent experimentally induced bovine respiratory syncytial virus and bovine viral diarrhoea virus infections on respiratory tract and enteric diseases in calves. *Am J Vet Res.*; 59(11):1423-1430.

Brown, T.T.; Bistner, S.I.; de Lahunta, A.; Scott, F.W.; McEntee, K.. (1975). Pathogenetic studies of infection of the bovine fetus with bovine viral diarrhoea virus. II. Ocular lesions. *Vet Pathol.*; 12(5-6):394-404.

Brown, T.T.; De Lahunte, A.; Scott, F.W.; Kahrs, R.F.; McEntee, K.; Gillespie, J.H.. (1973). Virus induced congenital anomalies of the bovine fetus. II. Histopathology of cerebellar degeneration (hypoplasia) induced by the virus of bovine viral diarrhoea-mucosal disease. *Cornell Vet.*; 63(4):561-578.

Brownlie, J., Clarke, M., Howard, C.. (1984). Experimental production of fatal mucosal disease induced in cattle. *Veterinary Record*, 114(22):535-536.

Brownlie, J..(1991). The pathways for bovine virus diarrhoea virus biotypes in the pathogenesis of disease. *Arch. Virol. Suppl.*; 3: 79-96.

Brownlie, J.; Clarke, M.C.; Howard, C.J.; Pocock, D.H.. (1987). Pathogenesis and Epidemiology of Bovine Virus Diarrhoea virus infection of cattle. *Annales de Recherches Vétérinaires*, 18 (2), pp.157-166.

Brownlie, J.; Clarke, M.C.; Howard, C.J.. (1989). Experimental infection of cattle in early pregnancy with a cytopathic strain of bovine virus diarrhoea virus. *Res. Vet. Sci.*; 46(3):307-311.

Brownlie, J.; Clarke, M.C.; Hooper, L.B.; Bell, G.D.. (1995). Protection of the bovine fetus from bovine viral diarrhoea virus by means of a new inactivated vaccine. *Vet Rec.*; 137(3):58-62.

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. XXII World Buiatrics Congress, Hannover, Germany, 18-23 August, p. 24-30.

Bruschke, C.J.; van Oirschot, J.T.; van Rijn, P.A..(1999). An experimental multivalent bovine virus diarrhoea virus E2 subunit vaccine and two experimental conventionally inactivated vaccines induce partial fetal protection in sheep. *Vaccine.*; 17(15-16):1983-1991.

Campbell, J.R.. (2004). Effect of bovine viral diarrhoea virus in the feedlot. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2004 Mar; 20(1):39-50.

Canário, Rodrigo Miguel Dias. (2009). Seroprevalência da diarreia viral bovina (bvd) em explorações de bovinos de carne na região do Alentejo. Tese apresentada ao Departamento de Ciências Veterinárias da Universidade de Trás-Os-Montes e Alto Douro para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária, orientada pelo Professor Dr. José Costa Mira. In: <http://hdl.handle.net/10348/2134>. Acedido em 23 de Maio de 2016.

Carlsson, U. & Belák, K.. (1994). Border disease virus transmitted to sheep and cattle by a persistently infected ewe: epidemiology and control. *Acta Vet. Scand.*; 35(1):79-88.

Carman, S.; van Dreumel, T.; Ridpath, J.; Hazlett, M.; Alves, D.; Dubovi, E.; Tremblay, R.; Bolin, S.; Godkin, A.; Anderson, N.. (1998). Severe acute bovine viral diarrhoea in Ontario, 1993–1995. *J Vet Diagn Invest.*; 10:27–35.

Casaro, A.P.; Kendrick, J.W.; Kennedy, P.C..(1971). Response of the bovine fetus to bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus. *Am J Vet Res.*; 32(10):1543-1562.

Chamorro, M.F.; Passler, T.; Givens, M.D.; Edmondson, M.A.; Wolfe, D.F.; Walz, P.H.. (2011). Evaluation of transmission of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) between persistently infected and naive cattle by the horn fly (*Haematobia irritans*). *Vet. Res. Commun.*; 35(2):123-129.

Chaves, Nancyleni Pinto, Bezerra, Danilo Cutrim, Sousa, Vanessa Evangelista de, Santos, Hamilton Pereira, & Pereira, Hélder de Moraes. (2010). Frequência de anticorpos e fatores de risco para a infecção pelo vírus da diarreia viral bovina em fêmeas bovinas leiteiras não vacinadas na região Amazônica Maranhense, Brasil. *Ciência Rural*, 40(6), 1448-1451. Epub June 25, 2010. <https://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782010005000089>

Childs, T. (1946). X disease in cattle. *Can J Comp Med.*; 10: 316-319 *In*: <http://www.bvd-info.ch/veterinarians/history.html>. Acedido em 23 de Março de 2016.

Collen, T. & Morrison, W. I.. (2000). CD4(+) T-cell responses to bovine viral diarrhoea virus in cattle. *Virus Res.* 67(1): 67-80.

Collen, T.; Carr, V.; Parsons, K.; Charleston, B.; Morrison, W.I.. (2002). Analysis of the repertoire of cattle CD4(+) T cells reactive with bovine viral diarrhoea virus. *Vet Immunol Immunopathol.*; 87(3-4):235-238.

Corapi, W. V.; French, T. W.; Dubovi, E. J.. (1989). Severe thrombocytopenia in young calves experimentally infected with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Journal of Virology*, 63(9), 3934–3943.

Corapi, W. V.; Elliott, R. D.; French, T.W.; Arthur, D.G.; Bezek, D.M.; Dubovi, E.J..(1990). Thrombocytopenia and hemorrhages in veal calves infected with bovine viral diarrhoea virus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*; 196(4):590-596.

Cornish, T.E., van Olphen, A.L., Cavander, J.L., Edwards, J.M., Jaeger, P.T., Vieyra, L.L., Woodard, L.F., Miller, D.R., O’Toole, D.. (2005). Comparison of ear notch immunohistochemistry, ear notch antigen-capture ELISA, and buffy coat virus isolation for detection of calves persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *Journal of*

Veterinary Diagnostic Investigation 17, 110–117. *In:* <http://vdi.sagepub.com/content/17/2/110.full.pdf+html>. Acedido em 19 de Junho de 2016.

Cortese, V.S.; Grooms, D.L.; Ellis, J.; Bolin, S.R.; Ridpath, J.F.; Brock, K.V.. (1998). Protection of pregnant cattle and their fetuses against infection with bovine viral diarrhea virus type 1 by use of a modified-live virus vaccine. *Am J Vet Res.*; 59(11):1409-1413.

Darbyshire, J.H. (1962). Agar gel diffusion studies with a mucosal disease of cattle. II. A serological relationship between mucosal disease and swine fever. *Res Vet Sci .*;3:125–128.

David, G.P., Crawshaw, T.R., Gunning, R.F., Hibberd, R.C., Lloyd, G.M., Marsh, P.R..(1994). Severe disease in adult dairy cattle in three UK dairy herds associated with BVD virus infection. *Vet Rec.*; 134:468–472.

Dean, H.J.; Hunsaker, B.D.; Bailey, O.D.; Wasmoen, T.. (2003). Prevention of persistent infection in calves by vaccination of dams with noncytopathic type-1 modified-live bovine viral diarrhea virus prior to breeding. *Am J Vet Res.*; 64(5):530-537.

Decaro, N., Lucente, M. S., Mari, V., Cirone, F., Cordioli, P., Camero, M., Sciarretta, R., Losurdo, M., Lorusso, E., Buonavoglia, C. (2011). Atypical Pestivirus and Severe Respiratory Disease in Calves, Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 17(8), 1549–1552.

Dehkordi, F. S. (2011). Prevalence study of Bovine viral diarrhea virus by evaluation of antigen capture ELISA and RT-PCR assay in Bovine, Ovine, Caprine, Buffalo and Camel aborted fetuses in Iran. *AMB Express.*; 1(1):32. *In:* <http://amb-express.springeropen.com/articles/10.1186/2191-0855-1-32>. Acedido em 17 de Junho de 2016.

Deregt, D. & Loewen, K.G. (1995). Bovine viral diarrhea virus: biotypes and disease. *The Canadian Veterinary Journal.*;36(6):371-378.

Doll, K. & Holsteg, M. (2013). BVD virus Type 2 outbreak in Germany. *In:* http://bvdday2013.eu/wp-content/uploads/2013/09/26-En-Doll_Holsteg_BVDV-2-OutbreakGermanyx.pdf. Acedido em 4 de Maio de 2016.

Done, J., Terlecki, S., Richardson, C., Harkness, J., Sands, J., Patterson, D., Sweasey, D., Shaw, I., Winkler, C., Duffell, S.. (1980). Bovine virus diarrhoea-mucosal disease virus: pathogenicity for the fetal calf following maternal infection. *Vet Rec* 106:473–479.

Driskell, E.A., Ridpath, J.F.. (2006). A survey of bovine viral diarrhoea virus testing in diagnostic laboratories in the United States from 2004 to 2005. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 18, 600–605.

Dubovi, E.J. (1994). Impact of bovine viral diarrhoea virus on reproductive performance in cattle. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* Nov;10(3):503-514.

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

Duffell, S.J.; Sharp, M.W.; Winkler, C.E.; Terlecki, S.; Richardson, C.; Done, J.T.; Roeder, P.L.; Herbert, C.N..(1984). Bovine virus diarrhoea-mucosal disease virus-induced fetopathy in cattle: Efficacy of prophylactic maternal pre-exposure. *Veterinary Record*;114:558-561.

Duffell, S.J. & Harkness, J.W..(1985). Bovine Virus Diarrhoea-Mucosal Disease Infection in Cattle. *Vet. Rec.* 117(10): 240-245.

Edwards, S. & Paton, D..(1995). Antigenic Differences Among Pestiviruses. *Veterinary Clinics of North America: food Animal Practise.* 11(3):563-577.

el-Kholy, A.A.; Bolin, S.R.; Ridpath, J.F.; Arab, R.M.; Abou-Zeid, A.A.; Hammam, H.M.; Platt, K.B.. (1998). Use of polymerase chain reaction to simultaneously detect and type bovine viral diarrhoea viruses isolated from clinical specimens. *Rev Sci Tech.*; 17(3):733-742.

Ellis, J.; West, K.; Cortese, V.; Konoby, C.; Weigel, D.. (2001). Effect of maternal antibodies on induction and persistence of vaccine-induced immune responses against bovine viral diarrhoea virus type II in young calves. *J Am Vet Med Assoc.*; 219(3):351-356.

Evermann, J.F. & Ridpath, J.F. (2002). Clinical and epidemiologic observations of bovine viral diarrhoea virus in the northwestern United States. *Vet Microbiol.*; 89(2-3):129-139.

Evermann, J.F. & Barrington, G. (2005). Clinical Features. In: Goyal SM, Ridpath JF. *Bovine Viral Diarrhoea Virus: Diagnosis, Management and Control*. 1ª ed. Oxford, UK: Blackwell Publishing:105-119.

Fairbanks, K. K.; Rinehart, C. L.; Ohnesorge, W. C.; Loughin, M. M.; Chase, C. C. (2004). Evaluation of fetal protection against experimental infection with type 1 and type 2 bovine viral diarrhoea virus after vaccination of the dam with a bivalent modified-live virus vaccine. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 225(12), 1898-1904.

Falcone, E.; Cordioli, P.; Tarantino, M.; Muscillo, M.; Sala, G.; La Rosa, G.; Archetti, I.L.; Marianelli, C.; Lombardi, G.; Tollis, M. (2003). Experimental infection of calves with bovine viral diarrhoea virus type-2 (BVDV-2) isolated from a contaminated vaccine. *Vet Res Commun.*; 27(7):577-589.

Ferrari, G., Scicluna, M.T., Bonvicini, D., Gobbi, C., Verità, F., Valentini, A. e Autorini, G.L. (1999). Bovine virus diarrhoea (BVD) control programme in an area in the Rome province (Italy). *Veterinary Microbiology*, 64, 237-245.

Flores E.F.(2003). Vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV). *Biológico, São Paulo*. 65(1-2): 3-9.

Flores, E.F, Weiblen, R., Vogel, F.S.F., Roehle, P.M., Alfieri, A.A., Pituco, E.M. (2005). A infecção pelo vírus da diarréia viral bovina (BVDV) no Brasil – histórico, situação atual e perspectivas. *Pesq. Vet. Bras.* 25: 125-134. Acedido em 23 de Maio de 2016. *In:* http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2005000300002_

Flores, E.F. (2007). Diagnóstico laboratorial das infecções víricas. In: FLORES, E.F. (Org). *Virologia veterinária*. Santa Maria: UFSM, p.295-326.

Fourichon, C.; Beaudou, F.; Bareille, N.; Seegers, H.. (2005). Quantification of economic losses consecutive to infection of a dairy herd with bovine viral diarrhoea virus. *Prev Vet Med.*; 72(1-2):177-181.

Fray, M.D.; Mann, G.E.; Clarke, M.C.; Charleston, B..(1999). Bovine viral diarrhoea virus: its effects on estradiol, progesterone and prostaglandin secretion in the cow. *Theriogenology.* 51(8):1533-1546.

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.

Fray, M.D.; Mann, G.E.; Clarke, M.C.; Charleston, B..(2000b). Bovine viral diarrhoea virus: its effects on ovarian function in the cow. *Vet. Microbiol.* 77(1-2):185-194.

Fray, M.D.; Supple, E.A.; Morrison, W.I.; Charleston, B..(2000a). Germinal centre localization of bovine viral diarrhoea virus in persistently infected animals. *Jor. Gen. Virol.* 81(Pt 7):1669-1673.

Fray, M.D.; Mann, G.E.; Bleach, E.C.; Knight, P.G.; Clarke, M.C.; Charleston, B.. 2002. Modulation of sex hormone secretion in cows by acute infection with bovine viral diarrhoea virus. *Reproduction*, 123, p.281–289.

Fredriksen, B; Press, C.M.; Løken, T.; Odegaard, S.A. (1999). Distribution of viral antigen in uterus, placenta and foetus of cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus. *Vet. Microbiol.* 64(2-3):109-122.

Fulton, R. W.; Ridpath, J. F.; Saliki, J. T.; Briggs, R. E.; Confer, A. W.; Burge, L. J.; Purdy, C.W.; Loan, R.W.; Duff, G.C.; Payton, M. E.. (2002). Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) 1b: predominant BVDV subtype in calves with respiratory disease. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 66(3): 181-190.

In: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC227002/>. Acedido em 15 de Junho de 2016.

Fulton, R.W. (2005). Vaccines. In: Goyal SM, Ridpath JF. Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis, Management and Control. 1^a ed. Oxford, UK: Blackwell Publishing:209-222.

Fulton, R. W., Whitley, E. M., Johnson, B. J., Ridpath, J. F., Kapil, S., Burge, L. J., Cook, B.J., Confer, A. W. (2009). Prevalence of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in persistently infected cattle and BVDV subtypes in affected cattle in beef herds in south central United States. Canadian Journal of Veterinary Research,73(4), 283–291. *In:* [https://www.researchgate.net/profile/Julia_Ridpath/publication/11235590_Bovine_viral_diarrhea_virus_\(BVDV\)_1b_Predominant_BVDV_subtype_in_calves_with_respiratory_disease/links/0deec528f989f573c9000000.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Julia_Ridpath/publication/11235590_Bovine_viral_diarrhea_virus_(BVDV)_1b_Predominant_BVDV_subtype_in_calves_with_respiratory_disease/links/0deec528f989f573c9000000.pdf). Acedido em 15 de Junho de 2016.

Fux, R. & Wolf, G. (2013). Transient elimination of circulating bovine viral diarrhoea virus by colostral antibodies in persistently infected calves: A pitfall for BVDV eradication programs? Veterinary Microbiology 161, 13–19.

In: <http://www.nationalmilklaboratories.co.uk/images/pdf/fux.pdf>. Acedido em 19 de Junho de 2016.

Galligan, D.T.; Groenendaal, H. & Mulder, H.A. (2004). An Economic Spreadsheet Model to Determine Optimal Breeding and Replacement Decisions for Dairy Cattle. J. Dairy Sci., 87: 2146-2157.

Gard, J.A.; Givens, M.D.; Stringfellow, D.A. (2007). Bovine viral diarrhoea virus (BVDV): epidemiologic concerns relative to semen and embryos. Theriogenology, Vol. 68(3):434-442.

Giangaspero, M.; Harasawa, R.; Zecconi, A.; Luzzago, C. (2001). Genotypic Characteristics of Bovine Viral Diarrhoea Virus 2 Strains Isolated in Northern Italy. Jour.Vet. Med. Sci. 63(9): 1045–1049.

Givens, M.D.; Heath, A.M.; Brock, K.V.; Brodersen, B.W.; Carson, R.L.; Stringfellow, D.A. (2003). Detection of bovine viral diarrhoea virus in semen obtained after inoculation of seronegative postpubertal bulls. Am. J. Vet. Res.; 64(4):428-434.

Givens, M.D. & Waldrop, J,G. (2004). Bovine viral diarrhoea virus in embryo and semen production systems. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.; 20(1): 21-38.

Gondim, A.C.L.O.2006. Diarréia Viral Bovina._Trabalho monográfico do curso de pós-graduação "Lato Sensu" em Produção e Reprodução de Bovinos apresentado à Universidade Castelo Branco, como requisito parcial para a obtenção de título de Especialista em Produção e Reprodução de Bovinos, sob a orientação do Prof. Dr. Luís Fernando Fiori Castilho. Brasília, Brasil, 2006. *In:* <http://docplayer.com.br/1085096-Ana-carolina-lima-de-oliveira-gondim.html>. Acedido em 5 de maio de 2016.

Goyal, S.M. (2005). Diagnosis. *In:* Goyal SM, Ridpath JF. Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis, Management and Control. 1ª ed. Oxford, UK: Blackwell Publishing.;197-208.

Grant Maxie, M. & Youssef, S. (2007). Nervous system. *In:* Grant Maxie M, editor. Jubb, Kennedy, and Palmer's pathology of domestic animals. 5th ed. Edinburgh: Saunders Elsevier; p. 319–320.

Grom, J. & Barlic-Maganja, D. (1999). Bovine viral diarrhoea (BVD) infections-control and eradication programme in breeding herds in Slovenia. *Vet Microbiol.*; 64(2-3):259-264.

Grooms, D.L.; Ward, L.A.; Brock, K.V. 1996. Morphologic changes and immunohistochemical detection of viral antigen in ovaries from cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *Am. J. Vet. Res.*, 57, p.830–833.

Grooms, D.L.; Brock, K.V.; Ward, L.A.(1998). Detection of bovine viral diarrhoea virus in the ovaries of cattle acutely infected with bovine viral diarrhoea virus. *Jour. Vet. Diagn. Invest.*10(2):125-129.

Grooms, D.L.; Brock, K.V.; Pate, J.L.; Day, M.L. (1998). Changes in ovarian follicles following acute infection with bovine viral diarrhoea virus. *Theriogenology*.49, p.595–605.

Grooms, D. L. (2004). Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 20:5-19.

Grooms, D. L. (2006). Reproductive losses caused by bovine viral diarrhoea virus and leptospirosis. *Theriogenology*, v.66. n.3. p.624-628.

Grooms D., Baker J.C., Ames T.R.. (2006). Doenças causadas pelo vírus da diarreia viral bovina. In: Smith BP. Medicina Interna de Grandes Animais. 3ª ed. São Paulo, Brasil: Manole, 2006:707-714.

Grooms, Daniel L.; Givens, M. Daniel; Sanderson, Michael W.; White, Bradley J.; Grotelueschen, Dale M.; Smith, David R..(2009). Integrated BVD Control Plans for beef Operations. The Bovine Practitioner, VOL. 43 (2): 106-116. In: <http://www.bvdconsult.com/wp-content/uploads/2013/supporting-articles/Overview-Grooms2009.pdf> Acedido em 7 de Maio de 2016.

Gunn, G.J.; Stott, A.W.; Humphry, R.W.. (2004). Modelling and costing BVD outbreaks in beef herds. The Vet. J.;167:143-149.

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 Medicine15;84(3-4):310-323.

Haines, D.M.; Martin, K.M.; Clark, E.G.; Jim, G.K.; Janzen, E.D.. (2001). The immunohistochemical detection of Mycoplasma bovis and bovine viral diarrhoea virus in tissues of feedlot cattle with chronic, unresponsive respiratory disease and/or arthritis. Can. Vet. J.; 42(11):857-860.

Hamers, C.; Couvreur, B.; Dehan, P; Letellier, C.; Lewalle, P.; Pastoret, P.P.; Kerkhofs, P.. (2000a). Differences in experimental virulence of bovine viral diarrhoea viral strains isolated from haemorrhagic syndromes. Vet J.; 160(3):250-258.

Hamers, C.; di Valentin, E.; Lecomte, C.; Lambot, M.; Joris, E.; Genicot, B.; Pastoret, P.P.. (2000b). Virus neutralizing antibodies against a panel of 18 BVDV isolates in calves vaccinated with Rispoval RS-BVD. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health; 47(10):721-726.

Hamers, C.; Di Valentin, E.; Lecomte, C.; Lambot, M.; Joris, E.; Genicot, B.; Pastoret, P.P. (2002). Virus neutralising antibodies against 22 bovine viral diarrhoea virus isolates in vaccinated calves. *Vet J.*; 163(1):61-67.

Harkness, J.W. (1987). The control of bovine viral diarrhoea virus infection. *Ann. Rech. Vet.*; 18(2):167-174. *In:* <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00901706/document>. Acedido em 4 de julho de 2016.

Harkness, J.W.; Roeder, P.L.; Drew, T.; Wood, L.; Jeffery, M. (1987). The efficacy of an experimental inactivated BVD-MD vaccine. *In: Agriculture: pestivirus infections of ruminants*. Ed. JW Harkness, EEC, Bruxelles.; 233-250.

Hertig, C.; Pauli, U.; Zanoni, R.; Peterhans, E. (1991). Detection of bovine viral diarrhea (BVD) virus using the polymerase chain reaction. *Vet. Microbiology.*; 26(1-2):65-76.

Heuer C., Healy A. & Zerbini C. 2007. Economic Effects of Exposure to Bovine Viral Diarrhea Virus on Dairy Herds in New Zealand. *J Dairy Sci.*; 90:5428-5438.

Hilbe, M.; Stalder, H.; Peterhans, E.; Haessig, M.; Nussbaumer, M.; Egli, C.; Schelp, C.; Zlinszky, K.; Ehrensperger, F. (2007). Comparison of five diagnostic methods for detecting bovine viral diarrhoea virus infection in calves. *J Vet Diagn Invest.*; 19(1):28-34. *In:* <http://vdi.sagepub.com/content/19/1/28.long>. Acedido em 17 de junho de 2016.

Holm, E.; Voss, H.; Jensen, N. P.; Larsen, L. E. & Uttenthal, Å. (2004). The use of different diagnostic tests in a herd with an unexpected case of a BVD virus positive calf. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias, Second European Symposium on: BVDV Control*. Pp.63-64. *In:* http://www.fmv.ulisboa.pt/spcv/PDF/pdf12_2004/552_39_82.pdf. Acedido em 8 de julho de 2016.

Horner, G.W.; Tham, K.M.; Orr, D.; Ralston, J.; Rowe, S.; Houghton, T. (1995). Comparison of an antigen capture enzyme-linked assay with reverse transcription--polymerase chain reaction and cell culture immunoperoxidase tests for the diagnosis of ruminant pestivirus infections. *Vet Microbiol.*; 43(1):75-84.

Howard, C. J., Clarke, M. C., & Brownlie, J. (1985). An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in cattle sera. *Veterinary microbiology*, 10(4), 359-369.

Howard, C. J., Clarke, M. C., Sopp, P., Brownlie, J. (1992). Immunity to bovine virus diarrhoea virus in calves: the role of different T-cell subpopulations analysed by specific depletion in vivo with monoclonal antibodies. *Vet Immunol Immunopathol.* 32.3 - 4: 303-314.

Houe, H.(1992). Age distribution of animals persistently infected with bovine virus diarrhoea virus in twenty-two Danish dairy herds. *Can. J. Vet. Res.*;56(3):194-198.

Houe, H.(1995). Epidemiology of bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*;11(3):521-547.

Houe, H.; Baker, J.C.; Maes, R.K.; Wuryastuti, H.; Wasito, R.; Rueqq, P.L.; Lloyd, J.W. (1995). Prevalence of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus in 20 dairy herds in two counties in central Michigan and comparison of prevalence of antibody-positive cattle among herds with different infection and vaccination status. *J. Vet. Diagn. Invest* 7: 321-326.

Houe, H. (1999). Epidemiological features and economical importance of bovine viral diarrhoea virus BVDV infection. *Vet. Microbiol.* 64(2-3): 89-107.

Houe, H. (2003). Economic impact of BVD infection in dairies. *Biologicals.* 31:137-143.

Houe, H.; Kjær-Ersbøll, A.; Lindberg, A., (2003). Metaanalysis for establishing the association between prevalence of infection with bovine virus diarrhoea virus (BVDV) and demographic risk factors. In *Proc. 10th International Symposium for Veterinary Epidemiology and Economics*, 17-21 November, Viña del Mar, Chile. International Society for Veterinary Epidemiology and Economics. *In: www.sciquest.org.nz.* Acedido em 22 de maio de 2016.

Houe, H., Lindberg, A., Moennig, V..(2006). Test strategies in bovine viral diarrhoea virus control and eradication campaigns in Europe. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 18, 427–436. *In:* <http://vdi.sagepub.com/content/18/5/427.full.pdf+html> Acedido em 19 de Junho de 2016.

Hyera JM, Liess B, Frey HR. Bovine viral diarrhoea virus infection in cattle, sheep and goats in northern Tanzania. *Trop Anim Health Prod.* 1991 May;23(2):83-94. PubMed PMID: 1650046.

Jubb, K.V.P. & Kennedy, P.C.(1963). *Pathology of Domestic Animals.* 1st ed., vol 2. New York: Academic Pr.;12–21.

Kafi, M.; Mcgowan, M.; Jillella, D. (1994). The effect of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) during follicular development on the superovulatory response of cattle. *Theriogenology* 41(1):223. *In:* [http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(05\)80133-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(05)80133-5). Acedido em 10 de Julho de 2016.

Kahn, C. (2010). *The Merck Veterinary Manual* (10th Ed.), Merial. Pp. 245 - Intestinal Disease in Ruminants. Merck & Co. Inc., Whitehouse Station, NJ. *In:* http://www.merckvetmanual.com/mvm/digestive_system/intestinal_diseases_in_ruminants/intestinal_diseases_in_cattle.html?qt=bvdv&alt=sh. Acedido em 1 de Junho de 2016.

Khan, F., Vorster, J.H., van Vuuren, M., Mapham, P. (2011). Evaluation of the effects of long-term storage of bovine ear notch samples on the ability of 2 diagnostic assays to identify calves persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *Journal of the South African Veterinary Association-Tydskrif Van Die SuidAfrikaanse Veterinere Vereniging* 82, 18–23. *In:* <http://www.scielo.org.za/pdf/jsava/v82n1/v82n1a06.pdf>. Acedido em 19 de junho de 2016.

Kelling, C.L.; Stine, L.C.; Rump, K.K.; Parker, R.E., Kennedy, J.E.; Stone, R.T.; Ross, G.S. (1990). Investigation of bovine viral diarrhoea virus infections in a range beef cattle herd. *J Am Vet Med Assoc.*; 197(5):589-593.

Kelling, C.L.; Grotelueschen, D.M.; Smith, D.R.; Brodersen, B.W.. (2000). Testing and Management Strategies for Effective Beef and Dairy Herd BVDV Biosecurity Programs, *The Bovine Practitioner* 34: 13-22. Acedido em 23 de junho de 2016. *In:* http://www.aabp.org/members/publications/2000/prac_jan_00/3-Kelling/3-Kelling-BVDV.html.

Kelling, C.L.; Steffen, D.J.; Topliff, C.L.; Eskridge, K.M.; Donis, R.O.; Higuchi, D.S.. (2002a). Comparative virulence of isolates of bovine viral diarrhea virus type II in experimentally inoculated six to nine month-old calves. *Am. J. Vet. Res.*; 63(10):1379-1384.

Kelling, C.L.; Steffen, D.J.; Cooper, V.L.; Higuchi, D.S.; Eskridge, K.M.. (2002b). Effect of infection with bovine viral diarrhea virus alone, bovine rotavirus alone, or concurrent infection with both on enteric disease in gnotobiotic neonatal calves. *Am. J. Vet. Res.* 63(8):1179-1186.

Kelling, C.L.. (2004). Evolution of bovine viral diarrhea virus vaccines. *Vet. Clin. Food Anim.*; 20:115-129.

Kelling, C.L.. (1996). Planing bovine viral diarrhea virus vaccination programs. *Vet. Med.-US.*, 9: 873-877.

Kendrick, J.W.. (1971). Bovine viral diarrhea-mucosal disease virus infection in pregnant cows. *Am J Vet Res.*; 32(4):533-544.

Kirkland, P.D.; Richards, S.G.; Rothwell, J.T.; Stanley, D.F.. (1991). Replication of bovine viral diarrhoea virus in the bovine reproductive tract and excretion of virus in semen during acute and chronic infections. *Vet. Rec.* 22;128(25):587-590.

Kovacs, F., Magyar, T., Rinehart, C., Elbers, K., Ohnesorge, W. (2003). The live attenuated bovine viral diarrhea virus components of a multivalent vaccine confer protection against fetal infection. *Vet. Microbiol.* 96:117.

Kovágo, C.; Forgách, P.; Szabára, Á.; Mándoki, M.; Hornyák, Á.; Duignan, C.; Pásztiné, Gere E.; Rusvai, M.. (2015). Seroprevalence of bovine viral diarrhoea virus in Hungary - situation before launching an eradication campaign. *Acta Vet Hung.* Jun;63(2):255-263.

Kuta, Aleksandra; Woźniakowski, Grzegorz; Polak, Mirosław. 2015. Cross-priming amplification for detection of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) species 1 and 2. *Journal of Applied Microbiology.*

Lanyon, S.R. & Reichel, M.P.. (2014). Bovine viral diarrhoea virus ('pestivirus') in Australia: to control or not to control? *Aust Vet J.*; 92(8):277-282.

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

Larson, R.L.. (2005). Management Systems and Control Programs. In: Goyal SM, Ridpath JF. *Bovine Viral Diarrhoea Virus: Diagnosis, Management and Control.* 1^a ed. Oxford, UK: Blackwell Publishing: 223-238.

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 Diarrhoea (BVD) Testing. *Bovine Practice* 39 (2): 96-100.

Larsson, B.; Jacobsson, S-O.; Mengtsson, B.; Alenius, S..(1991). Congenital curly haircoat as a symptom of persistent infection with bovine virus diarrhoea virus in calves. In: Liess B, Moennig V, Pohlenz J, Trautwein G, eds. *Ruminant Pestivirus Infections: Virology, Pathogenesis and Perspectives of Prophylaxis.* Archives of Virology – Supplementum 3. Wien, Austria and New York, USA: Springer-Verlag: 143-148.

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

Laven, R. (2008). Diagnosis of Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) - associated problems. *Livestock*, vol.13(3) p.37-41.

Lee, K.M. & Gillespie, J.H. (1957). Propagation of virus diarrhea virus of cattle in tissue culture. *Am J Vet Res.*; 18: 952. *In:* <http://www.bvd-info.ch/veterinarians/history.html>. Acedido em 23 de Março de 2016.

Leysen, P., De Clercq, E., Neyts, J. 2000. Perspectives for the Treatment of Infections with *Flaviviridae*. *Clinical Microbiology Reviews*;13(1):67-82. Acedido em 6 de maio de 2016. *In:* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC88934/pdf/cm000067.pdf>.

Liebler-Tenorio, E. M., Ridpath, J. E. & Neill, J. D. (2004). Distribution of viral antigen and tissue lesions in persistent and acute infection with the homologous strain of noncytopathic bovine viral diarrhoea virus. *J Vet Diagn Invest*, 16(5), 388-396.

Liebler-Tenorio E.M. Pathogenesis. (2005). *In:* Goyal SM, Ridpath JF. *Bovine Viral Diarrhoea Virus: Diagnosis, Management and Control*. 1ª ed. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2005:121-143.

Liess, B. & Moennig, V. (1990). Ruminant pestivirus infection in pigs. *Rev. Sci. Tech.*; 9(1):151-161.

Lindberg, A. L. & Alenius, S. (1999). Principles for eradication of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in cattle populations. *Vet Microbiol.*; 64(2-3):197-222.

Lindberg, A.; Groenendaal, H.; Alenius, S.; Emanuelson, U. (2001). Validation of a test for dams carrying fetuses persistently infected with bovine viral-diarrhoea virus based on determination of antibody levels in late pregnancy. *Prev. Vet. Med.*; 51(3-4):199-214.

Lindberg, A. L. (2003). Bovine Viral Diarrhoea virus infections and its control. A review. *Vet. Quart. Mar.*, 25(1):1-16.

Lindberg, A; Brownlie, J.; Gunn, G.J.; Houe, H; Moennig, V.; Saatkamp, H.W.; Sandvik, T.; Valle, P.S.. (2006). The control of bovine viral diarrhoea virus in Europe: today and in the future. *Rev. Sci. Tech. Off Int. Epiz.*, 25(3):961-979.

Lindenbach, B. D.; Thiel, H. J.; Rice, C. M.. (2007). Flaviviridae: The viruses and their replication, p. 1101-1152. In: D. M. Knipe and P. M. Howley (ed.), *Fields Virology*, Fifth ed, vol. 1. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.

Mars, M.H., Brusckhe, C.J.; van Oirschot, J.T.. (1999). Airborne transmission of BHV1, BRSV and BVDV among cattle is possible under experimental conditions. *Vet. Microbiol.*; 66(3):197-207.

McClurkin, A.W.; LittleDike, E.T.; Cutlip, R.C.; Frank, G.H.; Coria, M.R.; Bolin, S.R. (1984). Production of Cattle Immunotolerant to Bovine Viral Diarrhoea Virus, *Canadian Journal of Comparative Medicine* 48: 156-161.

McClurkin, A.W.; Coria, M.F.; Cutlip, R.C.. (1979). Reproductive performance of apparently healthy cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*; 174(10) 1116-1119.

McFadden, A., Tisdall, D., Hill, F., Otterson, P., Pulford, D., Peake, J., Finnegan, C., La Rocca, S., Kok-Mun, T., Weir, A.. (2012). The first case of a bull persistently infected with Border disease virus in New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal* 60, 290–296.

McGowan, M.R.; Kirkland, P.D.; Rodwell, B.J.; Kerr, D.R.; Carroll, C.L..(1993a). A field investigation of the effects of bovine viral diarrhoea virus infection around the time of insemination on the reproductive performance of cattle. *Theriogenology*. 39(2):443-449.

McGowan, M.R.; Kirkland, P.D.; Richards, S.G.; Littlejohns, I.R.. (1993b). Increased reproductive losses in cattle infected with bovine pestivirus around the time of insemination. *Vet Rec.* 133(2):39-43.

Meyling, A.; Ronsholt, L.; Dalsgaard, K.; Jensen, A.. (1987). Experimental exposure of vaccinated and non-vaccinated pregnant cattle to isoates of bovine viral diarrhoea virus (BVDV). in: J. Harkness (Ed.) CEC seminar on research on animal husbandry. Brussels. Commission of The European Communities, Belgium.:225–231.

Meyling, A. & Jensen, A.M.. (1988). Transmission of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) by artificial insemination (AI) with semen from a persistently-infected bull. *Vet. Microbiol.*; 17(2):97-105.

Meyling, A., Houe, H., Jensen, A.M.. (1990). Epidemiology of bovine virus diarrhoea virus. *Rev Sci Tech.*; 9(1):75-93.

Mirosław, P.: Polak, A.K.; Wiesław, R.; Jerzy, R.; Magdalena, L.; Żmudziński, J.F.. (2014). First report of bovine viral diarrhoea virus-2 infection in cattle in Poland. *Vet. J.*; 202(3):643-645.

Moennig, V & Liess, B.. (1995). Pathogenesis of intrauterine infections with bovine viral diarrhoea virus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.*;11(3):477-487.

Moennig V. & Brownlie J. (2006). Position paper: vaccines and vaccination strategies. EU Thematic Network on BVDV control.

Mota, V.A.S.. (2009). Diarreia Viral Bovina – Implementação de um Programa de Controlo e Biossegurança na Irlanda. Relatório final de estágio em Mestrado Integrado em Medicina Veterinária apresentado ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto, orientado pela Dra. Carla Maria Proença Noia de Mendonça, Porto.

Acedido em 6 de maio de 2016. *In:* <https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/9339/2/RelatorioViviana.pdf>

Muñoz-Zanzi, C.A.; Hietala, S.K.; Thurmond, M.C.; Johnson, W.O.. (2003). Quantification, risk factors, and health impact of natural congenital infection with bovine viral diarrhoea virus in dairy calves. *Am J Vet Res.*; 64(3):358-365.

Murphy, B.R., and Chanock, R.M.. (2001). Immunization against viral diseases. In *Fields Virology*, D.M. Knipe, *et al.*, eds. (Philadelphia, PA: Lippincott, Williams & Wilkins), pp. 435–468.

Murray, R.D. (1991). Lesions in aborted bovine fetuses and placenta associated with bovine viral diarrhoea virus infection. *Arch. Virol. Suppl.*; 3:217-224.

Nam, B., Li, G., Zheng, Y., Zhang, J., Shuck, K. M., Timoney, P. J., & Balasuriya, U. B. R. (2015). Complete Genome Sequence of Noncytopathic Bovine Viral Diarrhea Virus 1 Contaminating a High-Passage RK-13 Cell Line. *Genome Announcements*, 3(5). *In:* <http://genomea.asm.org/content/3/5/e01115-15.full.pdf+html>. Acedido em 7 de Julho de 2016.

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.

Niza-Ribeiro, J. (2008). BVDV – Epidemiologia em Portugal e impacto económico das infecções por BVDV. *In* PFIZER Saúde Animal, *Proceedings do Simposium de Lançamento da vacina PregSure® BVD*, Lisboa, 21 de Junho de 2008, pp.11-16.

Niza-Ribeiro, J.; Pereira, A.; Souza, J.; Madeira, H.; Barbosa, A.; Afonso, Carla. (2004). Prevalence of Bovine Viral Diarrhoea Virus in the Entre Douro e Minho region of Portugal. *In* Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias, Second European Symposium on: BVDV Control. Pp.45-46

Noiva, Rute Marina Garcia. (2010). Utilização de Imunohistoquímica e AgELISA para detecção de portadores do vírus da Diarreia Viral em Bovinos de Engorda. Dissertação apresentada na Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, para a obtenção do grau de mestre em Medicina Veterinária, orientada pela Dra. Maria de Conceição da Cunha e Vasconcelos Peleteiro, Lisboa.

In: <https://www.repository.utl.pt/bitstream/10400.5/2180/1/Utiliza%C3%A7%C3%A3o%20de%20Imunohistoqu%C3%ADmica%20e%20AgELISA%20para%20Detec%C3%A7%C3%A3o%20de%20Portadores%20do%20V%C3%ADrus%20da%20Diarreia%20Bovina%20Viral%20em%20Bovinos%20de%20Engorda.pdf>. Acedido em 7 de julho de 2016.

O'Connor, A.M., Reed, M. C., Denagamage, T. N., Yoon, K.-J., Sorden, S.D. (2007). Prevalence of calves persistently infected with bovine viral diarrhea virus in beef cow-calf herds enrolled in a voluntary screening project. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*; 230(11):1691-1696.

Olafson P., MacCallum A.D., Fox, A. (2002). An apparently new transmissible disease of cattle. *Cornell Vet.* 36 (1946): 205-213. Quoted by: Goens, D. "The evolution of bovine viral diarrhea: a review. *Can.Vet.J.*; 43(12): 946-954. *In:* <http://www.bvd-info.ch/veterinarians/history.html>. Acedido em 23 de março de 2016.

O'Neill R.; Wilson, B.; Regan, C.; Connaghan, E.; Mooney, J.. (2009). Patterns of BVD virus in laboratory submissions. *Ir. Vet. J.* 62: 679-683.

Otter A, Welchman DB, Sandvik T, Cranwell MP, Holliman A, Millar MF, Scholes SFE.. (2009). Congenital tremor and hypomyelination associated with bovine viral diarrhea virus in 23 British cattle herds. *Vet Rec.*; 164:771–778.

Pacheco, João Miguel da Costa. "Caracterização do Perfil de Risco e Avaliação de Práticas de Biossegurança em Explorações Produtoras de Leite". Dissertação apresentada no Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto para obtenção do grau de mestre e Medicina Veterinária, orientado pelo Professor Doutor João José Rato Niza Ribeiro, 2010.

Pavarini, Saulo P., Sonne, Luciana, Antoniassi, Nadia A.B., Santos, Adriana S. O, Pescador, Caroline A., Corbellini, Luís G., & Driemeier, David. (2008). Anomalias congênitas em fetos bovinos abortados no Sul do Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 28 (3), 149-154. Acedido em 19 de maio de 2016. *In:* http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2008000300004&lng=en&tlng=pt.

Pellerin, C., van den Hurk, J., Lecomte, J., Tijssen, P. (1994). Identification of a new group of bovine viral diarrhea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology*; 203:260–268.

Pellerin, C., Moir, S., Lecomte, J., Tijssen, P. (1995). Comparison of the p125 coding regions of bovine viral diarrhea viruses. *Vet. Microbiol.* 45:45-57.

Perdrizet, J.A.; Rebhun, W.C.; Dubovi, E.J.; Donis, R.O.(1987). Bovine virus diarrhea-clinical syndromes in dairy herds. *Cornell Vet.*;77: 46–74.

Pescador, C.A.; Corbellini, L.G.; Driemeier, D.; Gonçalves, R.K.; Cruz, C.E.F. Neurological disorder associated with pestivirus infection in sheep in Rio Grande do Sul, Brazil. *Ciência Rural, Santa Maria, V. 34, p.935-938, 2004.*

Peterhans, E., Jungi, T., Schweizer, M. (2003). BVDV and innate immunity. *Biologicals.* 31:12.

Peterhans, E.; Jungi, T.W.; Schweizer, M. (2006). How the bovine viral diarrhea virus outwits the immune system. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.*;113(4):124-129.

Peterhans, E., Bachofen, C., Stalder, H., & Schweizer, M. (2010). Cytopathic bovine viral diarrhea viruses (BVDV): emerging pestiviruses doomed to extinction. *Veterinary Research*, 41(6), 44. <http://doi.org/10.1051/vetres/2010016>.

Pimentel, T.C. (2011). Diarreia Viral Bovina – Contributo para o seu controlo. Dissertação apresentada na Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro para a obtenção do grau de mestre em Medicina Veterinária, orientada pelo Professor Doutor Filipe Silva. Vila Real.

Pinto, C., Medeiros, F., Geraldés, M., Flor, L., Garrett, F., Benevides S., Santos, V., Pinheiro I., Canada, N., Meireles, C.S., Rocha, A., Correia da Costa, J.M. (2004). Investigação de focos de abortos em bovinos leiteiros da ilha de São Miguel, Açores. *Revista Portuguesa de Ciências veterinárias. SUPL.* 126: 17-28.

Polak, M.P. e Zmudzinski, J.F. (1999). Prevalence of bovine viral diarrhoea virus infection in bulls in artificial insemination centers in Poland. *Veterinary Microbiology*, 64, 253-257. DOI: 10.1016/S0378-1135(98)00275-2

Potgieter, L.N.D.. (2004). Bovine viral diarrhoea and mucosal disease, p.946- 969. In: Coetzer J.A.W. & Tustin R.C. (ed.), *Infectious Diseases of Livestock in Southern Africa*. Vol.2. 2nd ed. Oxford University Press, Cape Town.

Potgieter, L.N.; McCracken, M.D.; Hopkins, F.M.; Walker, R.D.. (1984a). Effect of bovine viral diarrhoea virus infection on the distribution of infectious bovine rhinotracheitis virus in calves. *Am. J. Vet. Res.*; 45(4): 687-690.

Potgieter, L.N.; McCracken, M.D.; Hopkins, F.M.; Walker, R.D.; Guy, J.S.. (1984b). Experimental production of bovine respiratory tract disease with bovine viral diarrhoea virus. *Am. J. Vet. Res.*; 45(8):1582-1585.

Potgieter, L.N.; McCracken, M.D.; Hopkins, F.M., Guy, J.S.. (1985). Comparison of the pneumopathogenicity of two strains of bovine viral diarrhoea virus. *Am. J. Vet. Res.*; 46(1):151-153.

Presi, P.; Struchen, R.; Knight-Jones, T.; Scholl, S.; Heim, D.. (2011). Bovine viral diarrhoea (BVD) eradication in Switzerland--experiences of the first two years. *Prev Vet Med.*; 99(2-4):112-121.

Pritchard, W.R. (1963). The bovine viral diarrhoea-mucosal disease complex. *Adv. Vet. Sci.*; 8:1-47.

Qi, F.; Ridpath J.F.; Lewis, T; Bolin, S.R.; Berry E.S..(1992). Analysis of the bovine viral diarrhoea virus genome for possible cellular insertions. *Virology*; 189(1):285-292.

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

Radostits, O. M. & Littlejohns, I. R.. 1988 . New concepts in the pathogenesis, diagnosis and control of diseases caused by the bovine viral diarrhea virus. *The Canadian Veterinary Journal.* 29 (6): 513-528.

Radostits, O.M.; Gay, C.C.; Blood, D.C.; Hinchcliff, K.W.. (2000). *Veterinary Medicine: A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses.* 9ª ed. London, UK: W. B. Saunders: 1085-1105.

Radostits, O.M.; Gay, C.C.; Blood, D.C.; Hinchcliff, K.W.. (2002). *Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos.* 9. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabra Koogan, pp. 974-992.

Ramsey F.K. & Chivers W.H. (1953). Mucosal disease of cattle. *North America Veterinary* 34: 629-634. *In:* <http://www.bvd-info.ch/veterinarians/history.html>. Acedido em 23 de março de 2006.

Reinhardt, G., Riedemann, S., Ernst, S., Aguilar, M., Enriquez, R., & Gallardo, J. (1990). Seroprevalence of bovine viral diarrhea/mucosal disease in southern Chile. *Preventive veterinary medicine*, 10(1), 73-78.

Ribeiro, J.N.& 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 (549) 41-51. Acedido em 22 de maio de 2016. *In:* http://www.fmv.ulisboa.pt/spcv/edicao/3_2004/549_41_51.htm.

Ridpath, J.F; Bolin, S.R.; Dubovi, E.J. (1994). Segregation of bovine viral diarrhea virus into genotypes. *Virology.*; 205(1):66-74.

Ridpath, J. F., & Bolin, S. R. (1995). Delayed onset postvaccinal mucosal disease as a result of genetic recombination between genotype 1 and genotype 2 BVDV. *Virology*, 212(1), 259-262.

Ridpath, J.F. & Neill, J.D.. (2000). Detection and characterization of genetic recombination in cytopathic type 2 bovine viral diarrhoea viruses. *J. Virol.*; 74(18):8771-8774.

Ridpath, J.F.. (2005). Classification and Molecular Biology. In: Goyal SM, Ridpath JF. *Bovine Viral Diarrhoea Virus: Diagnosis, Management and Control*. 1^a ed. Oxford, UK: Blackwell Publishing, pp:65-80.

Ridpath, J.E.; Neill, J.D.; Endsley, J.; Roth, J.A.. (2003). Effect of passive immunity on the development of a protective immune response against bovine viral diarrhoea virus in calves. *Am J Vet Res.*; 64(1):65-69.

Ridpath, J.F., Fulton, R.W., Kirkland, P.D., Neill, J.D. (2010). Prevalence and antigenic differences observed between bovine viral diarrhoea virus subgenotypes isolated from cattle in Australia and feedlots in the southwestern united states. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 22 (2), pp. 184-191.

Riviera, Hermelinda. (2008). Evolución del conocimiento sobre la enfermedad de la diarrea viral bovina y su agente etiológico. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, Lima, 19 (2), pp.:93-112. Acedido em 5 de maio de 2016. In: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172008000200001&lng=es&nrm=iso.

Rocha, A. C..(2009). Aspectos da epidemiologia da infecção do vírus da diarreia viral bovina nas ilhas Flores e Corvo e efeito da idade na resposta imunitária à vacinação. Tese apresentada ao Departamento de Ciências Agrárias da Universidade dos Açores para obtenção do grau de Mestre em Produção Animal, orientada pelo Dr. Joaquim Fernando Moreira da Silva, Angra do Heroísmo.

Roeder, P.L. & Harkness, J.W.. (1986). BVD virus infection: prospects for control. *Vet Rec.*; 118(6):143-147.

Roeder, P.L.; Jeffrey, M.; Cranwell, M.P.. (1986). Pestivirus fetopathogenicity in cattle: changing sequelae with fetal maturation. *Vet Rec.*; 118(2):44-48.

Rondón- Barragán, Lang. (2006). Diarreia Viral Bovina: patogénesis e Inmunopatología. Rev. MVZ Córdoba 11 (1): 694-704. Acedido em 7 de julho de 2016. In: https://www.researchgate.net/publication/47435551_Diarrea_viral_bovina_patogenesis_e_inmunopatologia .

Rüfenacht, J., Schaller, P., Audigé, L., Knutti, B., Küpfer, U., Peterhans, E.. (2001). The effect of infection with bovine viral diarrhoea virus on the fertility of Swiss dairy cattle. Theriogenology. 15;56(2):199-210.

Sandvik, T. (1999). Laboratory diagnostic investigations for bovine viral diarrhoea virus infections in cattle. Veterinary Microbiology, 64, 123-134.

Sandvik, T.. (2005). Selection and use of laboratory diagnostic assays in BVD control programmes. Prev Vet Med.; 72(1-2):3-16.

Schreiber, P.; Dubois, F.; Drèze, F.; Lacroix, N.; Limbourg, B.; Coppe, P.. (1999). Prevalence of bovine virus diarrhoea virus infection in Belgian white blue cattle in southern Belgium. Vet Q.; 21(1):28-32.

Scott, F.W.; Kahrs, R.F.; Parsonson, I.M.. (1972). A cytopathogenic strain of bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus isolated from a bovine fetus. Cornell Vet.; 62(1):74-84.

Scott, F.W.; Kahrs, R.F.; De Lahunte, A.; Brown, T.T.; McEntee, K.; Gillespie, J.H.. (1973). Virus induced congenital anomalies of the bovine fetus. I. Cerebellar degeneration (hypoplasia), ocular lesions and fetal mummification following experimental infection with bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus. Cornell Vet.; 63(4):536-560.

Shannon, A.D.; Richards, S.G.; Kirkland, P.D.; Moyle, A.. (1991). An antigen-capture ELISA detects pestivirus antigens in blood and tissues of immunotolerant carrier cattle. Journal of Virological Methods; 34: 1–12.

Shin T. & Acland H. (2001). Tissue distribution of bovine viral diarrhoea virus antigens in persistently infected cattle. *J. Vet. Sci.* 2(2):81-84.

Silva, Letícia Carrão. (2014). Prevalência e Fatores de Risco Associados ao Vírus da Diarreia Viral Bovina no Estado de São Paulo, Brasil. 67p. Dissertação apresentada ao Instituto Biológico, na Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio, orientada pela Profª. Dra. Edviges Maristela Pituco, São Paulo. Acedido em 23 de maio de 2016. *In:* http://www.biológico.sp.gov.br/pos_graduacao/pdf/2014/leticia.pdf.

Smirnova, N.P.; Bielefeldt-Ohmann, H.; Van Campen, H.; Austin, K.J.; Han, H.; Montgomery, D.L.; Shoemaker, M.L., Van Olphen, A.L., Hansen, T.R.. (2008). Acute non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus infection induces pronounced type I interferon response in pregnant cows and fetuses. *Virus Research*, v.132. n.1-2. p.49-58.

Smith, B.P. (2009). *Large Animal Internal Medicine*, 4ª Edição, Mosby Elsevier, p. 340-371, 1612-1617.

Solis-Calderon, J.J.; Segura-Correa, V.M.; Segura-Correa, J.C.. (2005). Bovine viral diarrhoea virus in beef cattle herds of Yucatan, Mexico: seroprevalence and risk factors. *Prev Vet Med.*; 72(3-4):253-262.

Sørensen, J. T., & Østergaard, S. (2003). Economic consequences of postponed first insemination of cows in a dairy cattle herd. *Livestock Science*, 79, 145–153.

Ssentongo, Y.K., Johnson, R.H., Smith, J.R.. (1980). Association of bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus with ovaritis in cattle. *Aust Vet J.* 56(6):272-273.

Stahl, K. & Alenius, S.. (2012). BVDV control and eradication in Europe - an update. *Japanese Journal of Veterinary Research*, v. 60, n. 4, p. 31-39. Acedido em 23 de Junho de 2016. *In:* <http://eprints.lib.hokudai.ac.jp/dspace/bitstream/2115/48530/1/60,%20Suppl.-4.pdf>.

Stilwell, George. (2013). *Clínica de Bovinos*. Edição: Ciência & Vida. Edição Especial para a Bayer. Lisboa, Portugal. 320pp.

Stilwell, George; Matos, Miguel; Carolino, Nuno. (2007). A seroprevalência de anticorpos contra quatro vírus respiratórios em vacadas de carne do Ribatejo. *Rev. Port. Cien. Vet.*. 102 (561-562): 97-105. *In:* http://www.fmv.ulisboa.pt/spcv/PDF/pdf6_2007/97-105.pdf. Acedido em 23 de maio de 2016.

Stoffregen, B.; Bolin, S.R.; Ridpath, J.F.; Pohlenz, J.. (2000). Morphologic lesions in type 2 BVDV infections experimentally induced by strain BVDV2-1373 recovered from a field case. *Vet Microbiol.*; 77(1-2):157-162.

Straver, P.J.; Journée, D.L.; Binkhorst, G.J.. (1983). Neurological disorders, virus persistence and hypomyelination in calves due to intra-uterine infections with bovine virus diarrhoea virus. II. Virology and epizootiology. *Vet. Q.*;5(4):156-164.

Swasdipan, S.; McGowan, M.; Phillips, N.; Bielefeldt-Ohmann, H.. (2002). Pathogenesis of transplacental virus infection: pestivirus replication in the placenta and fetus following respiratory infection. *Microb Pathog.*; 32(2):49-60.

Szabára, Á.; Lang, Z.; Földi, J.; Hornyák, Á.; Abonyi, T.; Ózsvári, L.. (2016). Prevalence of bovine viral diarrhoea virus in cattle farms in Hungary. *Acta Veterinaria Hungarica* 64 (2), pp. 263–272. *In:* <http://www.akademiai.com/doi/pdf/10.1556/004.2016.026>. Consultado em 4 de julho de 2016.

Talafha, A.Q., Hirche, S.M., Ababneh, M.M., Al-Majali, A.M., Ababneh, M.M.. (2009). Prevalence and risk factors associated with bovine viral diarrhoea virus infection in dairy herds in Jordan. *Trop. Anim. Health Prod.*; 41(4):499-506.

Tao J, Liao J, Wang Y, Zhang X, Wang J, Zhu G. Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in pigs. *Vet Microbiol.* 2013 Aug 30;165(3-4):185-9. doi: 10.1016/j.vetmic.2013.03.010. Review. PubMed PMID: 23587625.

Tarry, D.W.; Bernal, L.; Edwards, S.. (1991). Transmission of bovine virus diarrhoea virus by blood feeding flies. *Veterinary Record*; 128:82-84.

Terpstra, C. & Wensvoort, G.(1988). Natural infections of pigs with bovine viral diarrhoea virus associated with signs resembling swine fever. *Res Vet Sci.*; 45(2):137-142.

Thurmond M.C. (2005). Virus Transmission, p.91-104. In: Goyal S.M. & Ridpath J.F. (Eds), *Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis, management and control*. Blackwell Publishing, Oxford, UK.

Thurmond, M.C.; Muñoz-Zanzi, C.A.; Hietala, S.K.. (2001). Effect of calfhooD vaccination on transmission of bovine viral diarrhoea virus under typical drylot dairy conditions. *J Am Vet Med Assoc.*; 219(7):968-975.

Tråvén, M., Alenius, S., Fossum, C. and Larsson, B. (1991). Primary Bovine Viral Diarrhoea Virus Infection in Calves Following Direct Contact with a Persistently Viraemic Calf. *Journal of Veterinary Medicine Series B*, 38: 453–462.

Underdahl, N.R.; Grace, O.D.; Hoerlein, A.B. (1957). Cultivation in tissue culture of cytopathogenic agent from bovine mucosal disease. *Proc. Soc. Biol. Med.*94:795. In: <http://www.bvd-info.ch/veterinarians/history.html>. Acedido em 23 de março de 2016.

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

Van Campen, H.; Vorpahl, P.; Huzurbazar, S.; Edwards, J.; Cavender, J.. (2000). A case report: evidence for type 2 bovine viral diarrhoea virus (BVDV)-associated disease in beef herds vaccinated with a modified-live type 1 BVDV vaccine. *J Vet Diagn Invest.*; 12(3):263-265.

Van Metre, D., Tennant, B.C. & Whitlock, R.H. (2008). Infectious diseases of the gastrointestinal tract – Adults: Bovine Virus Diarrhea. In: T.J. Divers & S.F. Peek, editors. Diseases of Dairy Cattle. 2nd edition. (pp 258-273). St. Louis Missouri: Saunders Elsevier.

Van Oirschot, J.T.; Brusckhe, C.J.; van Rijn, P.A.. (1999). Vaccination of cattle against bovine viral diarrhoea. *Vet Microbiol.*; 64(2-3):169-183.

Van Winden, S., Stevens, K., Guitian, J., & McGowan, M. (2005). Preliminary Findings of a Systematic Review and Expert Opinion Workshop on Biosecurity on Cattle Farms in the UK. *Cattle Practice*, 13(2), 135–140

Vaughn, M. (1997). SN titer response comparisons among fourteen diagnostic laboratories for antibodies protecting against IBR, BVD and BRSV virus following the administration of modified live vaccine to weaning aged calves. Proceedings of the 30th annual convention of the American Association of Bovine Practitioners, Montreal, Canada. Pp 141-144.

Vilcek, S.; Nettleton, P.F.; Paton, D.J.; Belak, S.. (1997). Molecular characterization of ovine pestiviruses. *Journal of General Virology*. 78(4): 725–735.

Virakul, P., Fahning, M.L.; Joo, H.S.; Zemjanis, R.. (1988). Fertility of cows challenged with a cytopathic strain of bovine virus diarrhea virus during an outbreak of spontaneous infection with a noncytopathic strain. *Theriogenology*, Stoneham, v.29, p.441-449.

Ward, G.M.; Roberts, S.J.; McEntee, K.; Gillespie, J.H.. (1969). A study of experimentally induced bovine viral diarrhea-mucosal disease in pregnant cows and their progeny. *Cornell Vet.*; 59(4):525-538.

Werdning, R. E.; Ames, T.R.; Goyal, S.M.; DeVries, G.P.. (1989). Diagnostic Investigation of Bovine Viral Diarrhea Infection in a Minnesota Dairy Herd. *J. Vet. Diagn. Invest.*1: 57-61.

Whitmore, H.L.; Zemjanis, R.; Olson, J.. (1981). Effect of bovine viral diarrhea virus on conception in cattle. *J Am Vet Med Assoc*. 178(10):1065-1067.

Wittum, T.E.; Grotelueschen, D.M.; Brock, K.V.; Kvasnicka, W.G.; Floyd, J.G.; Kelling, C.L.; Odde, K.G. (2001). Persistent bovine viral diarrhoea virus infection in US beef herds. *Prev. Vet Med.* 13; 49(1-2):83-94.

Wolf, G.. 1997. BVD/MD als Herdenproblem. ITB – Schriftenreihe, Bd. 1:87-98. Verlag Hieronymus, München.

Xue, W., Mattick, D., Smith, L., Maxwell, J.. (2009). Fetal protection against bovine viral diarrhoea virus types 1 and 2 after the use of a modified-live virus vaccine. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 73(4): 292–297. Acedido em 7 de maio de 2016. *In*: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2757710/pdf/cjvr_10_292.pdf.

Zimmer, G.M.; Wentink, G.H.; Brusckhe, C.; Westenbrink, F.J.; Brinkhof, J.; de Goey, I.. (2002). Failure of foetal protection after vaccination against an experimental infection with bovine virus diarrhoea virus. *Veterinary Microbiology*; 89(4): 255-265.

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.

Sites consultados

OIE – World Organization for Animal Health. Chapter 2.4.8. – Bovine Viral Diarrhoea. *In*: Terrestrial Animal Health Code. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2015.

In: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2008/pdf/2.04.08_BVD.pdf. Acedido em 20 de março de 2016.

ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses). 2014. *In*: <http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp> . Consultado em 17 de março de 2016.

<http://www.bvd-info.ch/veterinarians/vaccination.html>. Acedido em 8 de julho de 2016.

Anexos

Anexo 1

Portaria n.º 56/2016 de 21 de junho

(Normas relativas ao controlo do vírus da Diarreia Viral Bovina)

S.R. DA AGRICULTURA E AMBIENTE
Portaria n.º 56/2016 de 21 de Junho de 2016

Considerando o vírus da Diarreia Viral Bovina (doravante designada por BVD) e as consequências que tem nas explorações bovinas da Região Autónoma dos Açores;

Considerando que a maioria dos animais Persistentemente Infetados (doravante designados por PI) por BVD morre nos primeiros meses de vida, mas que alguns deles podem sobreviver até aos dois anos ou mais, podendo tornar-se reprodutores e transmitir o vírus;

Considerando que a infeção de fêmeas gestantes com a BVD pode resultar em perdas embrionárias e fetais, malformações congênicas, mortalidade neonatal e nascimento de bezerros fracos e inviáveis;

Considerando que a infeção fetal por estirpes de BVD não citopatogénico entre o 40.º e o 120.º dia de gestação, com frequência, é seguida de persistência viral devido a imunotolerância ao vírus infetante, não conseguindo o organismo do feto infetado jamais eliminar o vírus, originando por essa razão bezerros PI, que constituem o elo na cadeia epidemiológica da doença;

Considerando o impacto e os prejuízos económicos que os animais PI por BVD têm nas explorações açorianas;

Manda o Governo da Região Autónoma dos Açores, pelo Secretário Regional da Agricultura e Ambiente, ao abrigo da alínea d) do n.º 1 do artigo 90.º do Estatuto Político-Administrativo da Região Autónoma dos Açores, o seguinte:

Artigo 1.º

Objeto

A presente Portaria estabelece as normas relativas ao controlo do vírus da Diarreia Viral Bovina (doravante designada de BVD).

Artigo 2.º

Âmbito

O presente diploma aplica-se aos criadores que, em nome individual ou coletivo, sejam detentores de marcas oficiais de explorações bovinas localizadas na Região Autónoma dos Açores.

Artigo 3.º

Programa de Controlo da BVD

As explorações referidas no artigo 2.º devem cumprir com as normas estipuladas no Programa de Controlo da BVD elaborado pela Direção Regional da Agricultura.

Artigo 4.º

Abate

1 – Após diagnóstico dos bovinos como Persistentemente Infetados (doravante designados por PI) de BVD, o Serviço de Desenvolvimento Agrário de Ilha da área de localização da exploração notifica o detentor no prazo de cinco dias do mesmo.

2 – Após a notificação referida no número anterior e nos termos do Programa de Controlo da BVD, o detentor do animal deve mandar abater o mesmo no prazo de 15 dias úteis.

Artigo 5.º

Medidas subsequentes aos resultados dos testes

1- Nas explorações cujos animais forem abrangidos pelo Programa de Controlo da BVD o proprietário da mesma fica obrigado a:

a) Abater todos os animais PI de BVD, caso existam nos termos do artigo 4.º;

b) Identificar os animais nascidos na exploração com brincos de ADN, logo a partir da primeira data de colheita de sangue aos animais da sua exploração;

c) Deixar apenas entrar na exploração animais negativos ao Antígeno de BVD.

2 – Os brincos de ADN referidos na alínea b) do número anterior são disponibilizados gratuitamente pela Direção Regional da Agricultura até junho de 2017, sendo que a partir dessa data devem ser adquiridos pelos produtores nos termos e locais a serem indicados pela referida Direção Regional.

3 – É recomendado que o proprietário vacine os animais da exploração de acordo com as especificações da vacina utilizada, sendo que a escolha da mesma fica ao seu critério e do seu médico veterinário assistente.

4 - Nas explorações nas quais houver testagem apenas de determinados animais devido aos mesmos serem ascendentes ou descendentes de animais PI de BVD intervencionados noutras explorações, apenas é aplicável a medida prevista na alínea a) do número 1, salvo se a exploração em causa já tiver sido abrangida pelo Programa de Controlo da BVD e estiver obrigada às restantes medidas previstas no número 1, caso em que deve continuar a cumprir com todas as medidas.

Artigo 6.º

Comparticipação

Ao proprietário de bovino abatido no âmbito da presente portaria é atribuída a seguinte participação:

a) Pelo abate de fêmea com pelo menos um parto à data do diagnóstico laboratorial ou novilha primípara comprovadamente gestante na inspeção post mortem, é atribuída uma participação financeira no valor de 700 euros;

b) Pelo abate de fêmea que se destine a produção leiteira com idade igual ou superior a doze meses à data do diagnóstico laboratorial e que não cumpra com o disposto na alínea a), é atribuída uma participação financeira no valor de 400 euros.

Artigo 7.º

Concessão da participação

1 – A participação financeira prevista no presente diploma depende da apresentação de requerimento de candidatura.

2 – A comparticipação financeira é concedida desde que seja cumprido o previsto na presente portaria e no Programa de Controlo da BVD.

Artigo 8.º

Pagamento

- 1 - As comparticipações financeiras são pagas semestralmente.
- 2 - As comparticipações financeiras relativas ao primeiro semestre são pagas até ao dia 30 de setembro do ano a que se reportam.
- 3 - As comparticipações financeiras relativas ao segundo semestre são pagas até ao dia 30 de março do ano subsequente ao ano a que se reportam.

Artigo 9.º

Tramitação

- 1 – O requerimento de candidatura referido no número 1 do artigo 7.º é dirigido à Direção Regional da Agricultura e é entregue no Serviço de Desenvolvimento Agrário de Ilha da área de localização da exploração.
- 2 – O requerimento de candidatura é apresentado no prazo máximo de trinta dias após o abate do bovino.
- 3 - O requerimento previsto no número anterior deve ser acompanhado da identidade completa do candidato, nomeadamente a residência, número de identificação fiscal e identificação bancária.
- 4 - A falta da informação ou dos documentos previstos nos números anteriores acarreta a não atribuição da comparticipação financeira.

Artigo 10.º

Informação

- 1 - Para além das informações e documentos previstos no artigo 9.º, a Direção Regional da Agricultura pode solicitar informações e/ou documentos adicionais ao beneficiário.
- 2 - Caso o beneficiário não forneça as informações e/ou documentos solicitados, perde o direito à comparticipação financeira.

Artigo 11.º

Fiscalização

Compete à Direção Regional da Agricultura e aos Serviços de Desenvolvimento Agrário de Ilha proceder à verificação do cumprimento das regras previstas no presente diploma, através de controlos físicos e documentais.

Artigo 12.º

Incumprimento

- 1 - Salvo casos de força maior, o incumprimento do disposto na presente diploma, o incumprimento do disposto no Programa de Controlo da BVD, qualquer irregularidade verificada, bem como a prestação de

falsas declarações, acarretam a perda do direito à comparticipação financeira ou o reembolso do valor monetário da comparticipação concedida, acrescido de juros à taxa legal.

2 – O disposto no n.º 1 não prejudica a eventual responsabilidade civil e criminal.

Artigo 13.º

Financiamento e dotação orçamental

Os encargos resultantes do estipulado na presente portaria são suportados por dotação inscrita no orçamento da Direção Regional da Agricultura.

Artigo 14.º

Entrada em vigor

O presente diploma entra em vigor no dia seguinte à sua publicação.

Secretaria Regional da Agricultura e Ambiente.

Assinada em 15 de junho de 2016.

O Secretário Regional da Agricultura e Ambiente, *Luís Nuno Ponte Neto de Viveiros*.

Anexo 2

Procedimento técnico de colheita e envio de amostras para testes imunológicos

Colheita e Envio de Amostras para Testes Imunológicos

ALTERAÇÃO(S) À ÚLTIMA VERSÃO

Pág. 5

Pág. 6

Pág. 7

Pág. 8

Índice

1. Objetivo e âmbito.....	3
2. Referências.....	3
3. Definições e siglas.....	3
4. Responsabilidades.....	4
5. Procedimento.....	4
5.1 Material.....	4
5.2 Equipamento para conservação das amostras.....	5
5.3 Colheita de amostras para diagnóstico imunológico.....	5
5.4 Identificação das amostras.....	7
5.5 Envio das amostras para o Laboratório.....	8
6. Modelos.....	8

RESPONSÁVEIS PELO DOCUMENTO

Elaborado por	Nome	Função	Rubrica/Data
	Marco Barros	Técnico superior do setor de Serologia do LRV	
	Sandra Benevides	Responsável técnico do setor de Virologia do LRV	2012/04/30
Aprovado por	Valentina Santos	Gestor da Qualidade do LRV	2012/05/02

REGIÃO AUTÓNOMA DOS AÇORES SECRETARIA REGIONAL DA AGRICULTURA E FLORESTAS DIREÇÃO REGIONAL DO DESENVOLVIMENTO AGRÁRIO DIREÇÃO DE SERVIÇOS DE VETERINÁRIA	
Edição n.º 01 Revisão n.º 02 Data: 2012/05/02	LABORATÓRIO REGIONAL DE VETERINÁRIA Procedimento Técnico
Procedimento n.º: PT05 Página 3 de 8	
COLHEITA E ENVIO DE AMOSTRAS PARA TESTES IMUNOLÓGICOS	

1. Objetivo e âmbito

Fixar a metodologia de colheita e envio de amostras ao laboratório para testes imunológicos.

Aplica-se a material proveniente de animais vivos ou abatidos, colhidos no âmbito ou não dos planos de erradicação obrigatórios, do plano global de Sanidade Animal, projetos ou ainda para controlo e certificação de animais (importação/exportação).

2. Referências

- http://www.oie.int/eng/en_index.htm
- <http://www.lmv.min-agricultura.pt>
- Decreto - lei n.º 241/90, de 25 de Julho, D.R. n.º 170, I - Série;
- Portaria n.º 760/91, de 6 de Agosto, D.R. n.º 178, I - Série B;
- Decreto-lei n.º 244/2000, de 27 de Setembro, D.R. n.º 224, I - Série A;
- Decreto - Lei n.º 179/98, de 3 de Julho, D.R. n.º 151, I - Série -A
- Portaria n.º 430/98, de 25 de Julho, D.R. n.º 170, I Série-B
- Circular n.º 76 da Direcção Geral de Veterinária, de 05 de Novembro de 2002
- Circular n.º 44 e 45 da DGV/DSSA de 5/7/2002;
- Manual de Procedimentos para o Controlo Serológico da Brucelose nos Laboratórios de Diagnóstico Veterinário, DGV, Março de 2005.
- NP EN ISO/IEC 17025. Requisitos Gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração.
- OGC001 - Guia para a Aplicação da NP EN ISO/IEC 17025
- NP EN ISO 9000. Sistema de gestão da qualidade. Fundamentos e vocabulário.

3. Definições e siglas

- LRV – Laboratório Regional de Veterinária
- IBR/IPV – Rinotraqueíte infecciosa Bovina /Vulvovaginite Pustular Infecciosa
- BVD/MD – Diarreia Viral Bovina /Doença das Mucosas
- PPCB – Peripneumonia Contagiosa Bovina
- PRRS – Síndrome Reprodutivo Respiratório Porcino

Aprovado por: VS Modelo: 4F2010-02-11

- PROIBIDA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA DOCUMENTAÇÃO -

REGIÃO AUTÓNOMA DOS AÇORES SECRETARIA REGIONAL DA AGRICULTURA E FLORESTAS DIREÇÃO REGIONAL DO DESENVOLVIMENTO AGRÁRIO DIREÇÃO DE SERVIÇOS DE VETERINÁRIA	
Edição n.º 01 Revisão n.º 02 Data: 2012/05/02	LABORATÓRIO REGIONAL DE VETERINÁRIA Procedimento Técnico
Procedimento n.º: PT05 Página 4 de 8	
COLHEITA E ENVIO DE AMOSTRAS PARA TESTES IMUNOLÓGICOS	

Amostra.

Sangue de um animal colhido em tubo vacutainer ou seringa e agulha, com ou sem anticoagulante, acondicionado e identificado de acordo com os procedimentos à frente descritos.

Leite colhido em copo de colheita esterilizado, do conjunto das vacas em lactação da exploração ou individual, acondicionado e identificado de acordo com as condições indicadas no presente procedimento.

4. Responsabilidades

São responsáveis pela colheita de amostras, todos os médicos veterinários assim como todos os técnicos sob a sua supervisão.

5. Procedimento

Advertências

Durante o ato da colheita e envio (acondicionamento) das amostras, devem ser tomadas as precauções elementares de assepsia (uso de luvas, máscara vestuário e calçado apropriado).

O material descartável utilizado na colheita deverá ser colocado num contentor para lixo biológico para posterior descontaminação.

5.1 Material

- Seringa com agulha ou tubo de vácuo e agulha, descartável, próprio para colheita de sangue;
- Tubos de hemólise, preferencialmente em poliestireno ou outro material que facilite a coagulação do sangue;
- Tubos tipo Micronics
- Rótulos; caneta de tinta resistente à água,
- Suportes para os tubos de sangue;
- Caixa térmica estanque e respetivos termoacumuladores;

Aprovado por: VS Modelo: 4F2010-02-11

- PROIBIDA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA DOCUMENTAÇÃO -

- Copos de colheita, descartáveis, esterilizados individualmente, com tampa de rosca vedante;

5.2 Equipamento para conservação das amostras

- Frigorífico (5^o±3^oC);
- Congelador (-20^oC±5^oC)

5.3 Colheita de amostras para diagnóstico imunológico

Sangue

A colheita do sangue deverá ser executada do seguinte modo:
Raspar e desinfetar, com álcool sanitário, a zona de punção da veia jugular ou caudal. Retirar o sangue com seringa e agulha ou tubo de vácuo e agulha. Caso use seringa, o sangue é prontamente transferido para um tubo de hemólise. A quantidade de sangue colhido deve ser igual a 2/3 da capacidade do tubo. Os tubos devem ser devidamente identificados.

As amostras de sangue deverão ser deixadas à temperatura ambiente protegidas do calor ou do frio excessivo, até que o coágulo se forme e comece a retrair.
Caso não seja possível o pronto envio dos sangues para o laboratório, as amostras de sangue com coágulo devem ser refrigeradas (2 a 8^oC) até às 48 horas após a colheita. Caso o período seja superior, o soro deverá ser retirado para tubo tipo Micronics identificado e congelado. As amostras de sangue com anticoagulante devem ser entregues o mais rapidamente possível no laboratório e não deverão ser congeladas.

As colheitas de sangue para a Tuberculose devem ser efetuadas em tubos vacuainers com heparina *lithium*, as amostras devem ser enviadas o mais rapidamente possível ao laboratório, à temperatura ambiente (18^oC-25^oC), pois têm de ser trabalhadas antes das 8 horas após a colheita.

NOTA: A separação do soro (decantação) poderá ser feita apenas se houver condições próprias no local de tratamento das amostras. Caso contrário, deve

enviar-se o mais prontamente possível, logo após o período de retração do coágulo.

NOTA: Não devem ser enviadas para o laboratório amostras de sangue em seringas ou tubos onde ainda estejam acopladas as agulhas, dado o risco de infeção decorrente do respetivo manuseamento, durante a preparação das amostras.

Doenças diagnosticadas a partir das amostras de sangue

Piroplasmose	Leptospirose	Clamídioses	PRRS
Toxoplasmose	Brucelose	Aujeszky	BVD/MID
Babesias	PPCB	Leucose	Tuberculose
<i>Neospora caninum</i>	Paratuberculose	IBR/IPV	

Leite

A colheita poderá ser efetuada em leites provenientes do tanque de mistura, devendo ser executada do seguinte modo:

Amostras de leite do tanque de mistura:

Colher com um copo de colheita esterilizado cerca de 40 ml de leite do tanque para um frasco com cerca de 50 ml de volume.

O leite é refrigerado e expedido o mais rapidamente possível para o laboratório. As amostras devem ser identificadas.

Amostras de leite individual:

A colheita é efetuada na totalidade dos tetos dos animais.

Proceder à lavagem, desinfecção e secagem dos tetos. Os dois primeiros jatos de leite devem ser eliminados e só depois se retira a amostra.

Deve colher-se cerca de 10 ml de cada teto para um frasco estéril com cerca de 50 ml de volume. Identificar as amostras, refrigerar e expedir o mais rapidamente possível para o laboratório.

NOTA: A pesquisa de anticorpos anti-Brucella no leite apenas se efetua em leite de bovinos. Nunca deverão ser colhidas amostras de leites colostrais ou de animais com mamites.

NOTA: Não deverão ser enviadas ao laboratório amostras de leite que tenham sido processadas termicamente ou sujeitas a agitação violenta.

5.4 Identificação das amostras

Requisição de análises com sangue para rastreio por exploração

As amostras dum mesmo proprietário/exploração, são identificadas individualmente com um rótulo com o número de identificação animal (brinco). O conjunto das amostras deve ser colocado num suporte pela mesma ordem das folhas de campo do PISA e enviado o mais rapidamente para o laboratório.

Requisição de análises com soro para rastreio de IBR/IPV e BVD/MID

As amostras devem entrar no laboratório em tubos tipo Micronics, estas devem estar identificadas individualmente com um número de ordem e/ou nº brinco. O conjunto das amostras deve ser colocado em suportes para tubos Micronics pela mesma ordem das folhas de campo do pisa. Os tubos devem ser colocados no suporte sempre de cima para baixo, preenchendo a totalidade da coluna e da esquerda para a direita. A todos os animais que constam da folha de campo do PISA deverá corresponder um número de ordem.

NOTA: Todas as amostras de sangue/soro devem vir acompanhadas das respetivas folhas de requisição.

Requisição de análises com leite conjunto

As amostras de leite são identificadas com o número da exploração e/ou número do SERCLA.

As amostras de leite também podem entrar no laboratório em tubos tipo Micronics, estas devem estar identificadas individualmente com um número de ordem (1 a 92 ou 1.....). O conjunto das amostras deve ser colocado em suportes para tubos Micronics pela mesma ordem das folhas de requisição. Os tubos devem ser colocados no suporte sempre de cima para baixo, preenchendo a totalidade da coluna e da esquerda para a direita. As caixas devem vir identificadas (não na tampa). Exemplo: caixa 1, caixa 2,..... A todas as amostras que constam da folha de requisição deverá corresponder um número de ordem.

5.5 Envio das amostras para o Laboratório

As amostras devem ser acompanhadas de um impresso devidamente preenchido (Modelo - Folha de requisição de análises). O acondicionamento das amostras e dos conjuntos de amostras, por animal/requisição, deve ser feito de tal forma que evite qualquer derrama do conteúdo até à chegada ao Laboratório.

Sangue/soro - As amostras ainda com coágulos são enviadas refrigeradas (colheita há menos de 48 horas) ou congeladas, sem coágulo, (colheita há mais de 48 horas) acondicionadas dentro de uma caixa térmica com termoacumuladores.

Sangue com anticoagulante - As amostras de sangue com anticoagulante devem ser entregues o mais rapidamente possível no laboratório e não deverão nunca ser congeladas.

Leites - As amostras são enviadas refrigeradas (2-8°C) até 48 horas, acondicionadas dentro de uma caixa térmica com termoacumuladores; excedendo este prazo deverão ser enviadas congeladas (-20°C±5).

6. Modelos

Folha do PISA ou folhas de requisição de análises do LRV (Modelo 70-5, Modelo 70-6 e Modelos 70-09 e 70-10).

Anexo 3
Questionário epidemiológico

Inquérito Epidemiológico

1. Identificação do produtor

Nome do proprietário:

Marca da Exploração:

Morada:

Contacto:..... Freguesia: NIF:

Possui Tanque: Sim Não N° vacas

Localização da exploração:

Localização dos animais:

Veterinário da exploração:

Dimensão exploração:

2. Estrutura da manada

N° de vacas em produção

N° de vacas secas

N° de novilhas de 12 a 24 meses

N° de vitelos menores de 12 meses

N° de touros

N° total de cabeças

2.1. Possui outros animais: Sim Não

Ovelhas

Cabras

Cães

Outros

Os bovinos e outros animais podem estar de alguma forma em contacto entre si?

Sim Não Se sim como

3. Maneio dos vitelos

Tomaram colostro (S/N) Da própria mãe Outra vaca
 Quanto tempo?; Bebem que tipo de leite (V/S);
 Leite da própria mãe Outra vaca Leite da mãe e outras vacas
 Com que idade foram separados da mãe:; Estão estabulados (S/N);
 Presos à estaca (S/N) Outra

Destino dos machos:

Destino das fêmeas:

4. Maneio das novilhas

Pastam separadas das vacas (S/N)

Entrada no rebanho antes de parirem (S/N) ; Depois de parirem (S/N)

5- Maneio reprodutivo

Inseminação Artificial (S/N) ; Origem do sémen ; Inseminador
 ; Transferencia de embriões (S/N) ; Touro da exploração (S/N)
 Touro emprestado (S/N)

6- Principais problemas:

Nos machos; Balanopostite Outros.....

Nas fêmeas: Vulvovaginite Abortos Mamites Pústulas nas mucosas genitais; Retenção da placenta Mumificação do feto Diarreia Fetos com lesões hemorrágicas Fetos com mal formações congénitas Retorno ao cio após I.A ou monta natural Abortos Mortalidade embrionária Corrimento nasal Partos difíceis Outros

Nos jovens; Tosse Anorexia Rinite Conjuntivite Diarreias
 Pneumonias; respiração pela boca Outros

Nos vitelos: Diarreias (fatais) Tremores musculares Ataxia Cegueira
 Morte Meningoencefalite Pouco pesa à nascença Incapazes de crescer
 adequadamente Paralesia Exoftalmia Assimetria dos olhos
 Diminuição do reflexo patelar Broncopneumonias Perca de propriocepção
 Mal formações congénitas Nados mortos Outros

7. Práticas vacinais

1- Nunca vacinou Vacina actualmente Não vacina actualmente, mas já
 vacinou

2- Iniciativa da vacinação

Produtor Veterinário Outro

3- Motivo da vacinação

4- Escolha da vacina

Produtor Veterinário Outro

5- Efectivo vacinado

Vitelos menos de meses Novilhas Vacas

6- Frequência da vacinação

Anual Semestral Outra

7- Administração da vacina

Produtor Veterinário assistente Outro

8- Vacina utilizada

Triangle 9 (IBR, BVD, PI3, RSV, Leptospirose) Triangle 4 Hiprabovis 4
 (IBR, BVD, PI3, VRS) Rispoval 4 (IBR, BVD, PI3, RSV) Bovilis IBR
 gEmarcada Bovilis BVD Não sabe

8- Protecção dos animais da exploração

Tem explorações vizinhas Quantas Utilização de baldio (S/N)

Contacto com outros animais (S/N) De que forma

Ovelhas Cabras Porcos Cães Bovinos Outros

Participação animais feiras/exposições (S/N)

Efectua quarentena animais adquiridos (S/N) Todos

Duração Alguns Duração

Verifica o boletim sanitário (S/N)

Efectua controlos serologicos/bacteriológicos (S /N)

Quais..... Com que frequência

Presença de rodilúvio (S/N) Presença de pedilúvio (S/N)

9- Origem dos animais

Efectua Exportações: Sim Não Importações: Sim Não

Origem dos animais importados

Destino dos animais exportados

Foram comprados animais durante um período de 6 meses antes do início dos abortos? ..

.....

Foram introduzidos animais vindos de outras explorações, feiras, impérios, etc... ..

.....

Datas entrada (mês/ano):