

MIGUEL MARDEL CORREIA PARREIRA

**SEROPREVALÊNCIA DE BORDER DISEASE EM
PEQUENOS RUMINANTES NA REGIÃO DO
BAIXO ALENTEJO**

Orientador: Dr. José Costa Mira
Co-orientadora: Doutora Ângela Dâmaso

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
Faculdade de Medicina Veterinária**

Lisboa
2012

MIGUEL MARDEL CORREIA PARREIRA

**SEROPREVALÊNCIA DE BORDER DISEASE EM
PEQUENOS RUMINANTES NA REGIÃO DO
BAIXO ALENTEJO**

Dissertação apresentada 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

Orientador: Dr. José Costa Mira
Co-orientadora: Doutora Ângela Dâmaso

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa
2012

Todas as afirmações efectuadas no presente documento são da exclusiva responsabilidade do autor, não cabendo qualquer responsabilidade à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias pelos conteúdos nele apresentados.

Agradecimentos

À minha família, principalmente aos meus pais, por todo o apoio e paciência durante a realização do curso e desta dissertação. Pelos valores que me têm transmitido ao longo da minha vida, que me ajudaram a nível pessoal e profissional.

Ao Dr. José Costa Mira, não só pela transmissão de conhecimentos profissionais ao longo de todo o estágio, mas também por toda a amizade e disponibilidade que sempre demonstrou.

À professora Ângela Dâmaso, pelos conhecimentos transmitidos ao longo do curso e pela ajuda preciosa na realização desta dissertação.

Ao Sr. Godinho, Rui, Zé Lampreia e colega de estágio André, pela ajuda, convivência e amizade.

A todos os meus amigos de Elvas que sempre me apoiaram em todas as fases da minha vida e que sempre me demonstraram poder contar com eles.

A todos os meus colegas de curso, não só pela amizade demonstrada mas também pela ajuda na concretização do curso.

Resumo

A “Border Disease” é uma doença infecciosa causada por um pestivírus que afecta maioritariamente pequenos ruminantes, causando problemas reprodutivos, alterações congénitas e animais persistentemente infectados. Não existem registos da seroprevalência desta patologia em Portugal.

O objectivo deste trabalho foi estudar a seroprevalência de “Border Disease” em explorações de pequenos ruminantes na região do Baixo Alentejo e relacioná-la com a raça dos animais, dimensão do efectivo, coabitação com bovinos e localização da exploração.

Em 197 animais, observaram-se 10 seropositivos que correspondem a uma seroprevalência de 5%. Em 29 explorações observaram-se 6 positivas nas quais, havia pelo menos um animal seropositivo, que corresponde a 20,6 % das explorações. Não foi observada relação significativa da prevalência nas explorações com as raças dos animais, a dimensão do efectivo e a sua localização geográfica. Existe maior probabilidade de casos seropositivos de “Border Disease” em pequenos ruminantes que coabitem com bovinos.

A seroprevalência de “Border Disease” é baixa na região do Baixo Alentejo. Mais estudos devem ser efectuados de forma a identificar a estirpe do vírus “Border Disease” (BDV) presente nesta região, a verificar se a seroconversão poderá ter origem no contacto com o vírus da diarreia viral bovina (BVDV) e estudar o impacto desta doença na produção de pequenos ruminantes no Baixo Alentejo.

Palavras-chave: “Border Disease”, seroprevalência, pequenos ruminantes, Baixo Alentejo.

Abstract

Border Disease is an infectious disease caused by a pestivirus which affects mainly small ruminants causing reproductive problems, congenital anomalies and persistently infected animals. There is no record of the prevalence of the disease in Portugal.

The objective of this paper was to study the prevalence of Border Disease in small ruminant farms in the Baixo Alentejo and relate it to the race of animals, herd size, cohabitation with cattle and location of the farm.

In 197 animals, 10 were seropositive corresponding to a prevalence of 5%. On 29 farms, 6 were positive in which, at least one animal was seropositive, which corresponds to 20.6% of farms. No significant relation was observed between prevalence with the breeds of the animals, herd size or location of the farm. There is a higher probability of seropositive cases of "Border Disease" in small ruminants living together with cattle.

The prevalence of "Border Disease" is low in the region of Baixo Alentejo. More studies should be undertaken to identify the strain of Border Disease Virus (BDV) present in this region, verify if seroconversion may be caused by contact with bovine viral diarrhea virus (BVDV) and study the impact of this disease in the production of small ruminants in the Baixo Alentejo.

Keywords: Border Disease, prevalence, small ruminants, Baixo Alentejo.

Lista de Siglas e Abreviaturas

BD – Border Disease

BDV – Vírus Border Disease

CSFV – Vírus peste suína clássica

BVDV – Vírus da diarreia viral bovina

BVDV-1 – Vírus da diarreia viral bovina tipo 1

BVDV-2 – Vírus da diarreia viral bovina tipo 2

RNA – Ácido ribonucleico

ORF – Open reading frame

N^{pro} – N-terminal protease

C – Proteína da cápside

E^{ns} – Envelope protein RNase secreted

E1 / E2 – Envelope protein 1 / 2

NS2-3 – Nonstructural protein 2-3

NS4A – Nonstructural protein 4A

NS4B – Nonstructural protein 4B

NS5A – Nonstructural protein 5A

NS5B – Nonstructural protein 5B

PI – Permanentemente Infectado

BDV-1 – Vírus Border Disease tipo 1

BDV-2 – Vírus Border Disease tipo 2

BDV-3 – Vírus Border Disease tipo 3

BDV-4 – Vírus Border Disease tipo 4

BDV-5 – Vírus Border Disease tipo 5

BDV-6 – Vírus Border Disease tipo 6

SNC – Sistema Nervoso Central

AST – Aspartato Transaminase

LDH – Desidrogenase Láctica

HDL – Lipoproteínas de alta densidade

ALP – Fosfatase Alcalina

ELISA - Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay

RT-PCR – Reverse transcription polymerase chain reaction

OIE – Office International des Epizzoties

Índice

Agradecimentos	3
Resumo	4
Abstract.....	5
Lista de Siglas e Abreviaturas	6
Índice de Figuras	9
Índice de Tabelas	11
1. Introdução	12
2. Revisão Bibliográfica	13
2.1. “Border Disease”	13
2.1.1. Descrição do Agente Etiológico	13
2.1.2. Epidemiologia	20
2.1.3. Patogenia.....	21
2.1.4. Sinais clínicos	26
2.1.5. Diagnóstico Diferencial	32
2.1.6. Achados Laboratoriais	37
2.1.7. Achados de Necrópsia.....	38
2.1.8. Meios de Diagnóstico	38
2.1.9. Tratamento	43
2.1.10. Controlo Sanitário.....	43
2.1.11. Vacinação.....	45
2.1.12. “Border Disease” em Caprinos	46
2.1.13. Importância Económica	47
3. Objectivo	49
4. Material e Métodos.....	50
4.1. Caracterização da Área Geográfica, das Explorações e dos Animais	50
4.1.1. Selecção de amostras a recolher por exploração.....	52
4.1.2. Colheita e envio das amostras.....	54
4.1.3. Análises serológicas - ELISA	54
4.1.4. Validação e cálculos	56
4.1.5. Classificação dos resultados	56
4.1.6. Análise Estatística.....	57
4.2. Resultados	58
4.2.1. Seroprevalência das Explorações.....	58
4.2.2. Seroprevalência das Amostras	59
4.2.3. Relação entre Seroprevalência e Raça dos Animais	61
4.2.4. Relação entre Seroprevalência e Dimensão do Efectivo de cada Exploração ..	62

4.2.5.	Relação entre Seroprevalência e Explorações com Coabitação com Bovinos .	63
4.2.6.	Relação entre Seroprevalência e Localização Geográfica	65
5.	Discussão	68
6.	Conclusão	73
7.	Bibliografia.....	74
7.	Anexos.....	84

Índice de Figuras

Figura 1: Vírus da família <i>Flaviviridae</i> com relevância em medicina veterinária. (Adaptado de Quinm <i>et al.</i> , 2003)	14
Figura 2: Imagem microscópica de pestivírus (Adaptado de Syva, 2005).....	15
Figura 3: Esquema ilustrativo de um pestivírus com as proteínas estruturais E1, E2 e E ^{ms} (Adaptado de Syva, 2005).	15
Figura 4: Diagrama representativo do conjunto das proteínas estruturais e não estruturais que fazem parte da poliproteína codificada pelos pestivírus. (Adaptado de Aitken, 2007).	15
Figura 5: 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. (Adaptado de Leyssen <i>et al.</i> , 2000).	19
Figura 6: Esquema ilustrativo dos vários cenários possíveis de infecções de BDV antes e depois dos fetos adquirirem imunidade entre o 60º e o 85º dia de gestação (Adaptado de Nettleton <i>et al.</i> , 2007).	22
Figura 7: Borregos da raça Cheviot com 7 meses de idade, ambos persistentemente infectados com BDV. Enquanto um apresenta aparência e tamanho normal para a idade o outro é bastante atrofiado. As infecções ocorreram no mesmo estágio de gestação e com o mesmo tipo de vírus (Adaptado de Nettleton <i>et al.</i> , 2007).	24
Figura 8: Feto abortado devido a uma infecção de Border Disease (Adaptado de Babak, 2007)	28
Figura 9: Borrego infectado com Border Disease em que apresenta artrogripose e articulação lateralizada. (Adaptado de García-Pérez <i>et al.</i> , 2008).	29
Figura 10: Borregos infectados com Border Disease em que um apresenta prognatismo e o outro braquignatismo. (Adaptado de García-Pérez <i>et al.</i> , 2008).	29
Figura 11: Borrego infectado com Border Disease (primeiro plano) comparado com borrego saudável (segundo plano) (Adaptado de Babak, 2007).	30
Figura 12: Borrego infectado com Border Disease com os sinais típicos de alteração de pêlo: Aumento do tamanho e hiperpigmentação do pêlo (Adaptado de Gates, 1994).	30

Figura 13: Cérebro com hipoplasia cerebelar (direito) dum animal infectado com BD em comparação com um cérebro de borrego normal (esquerdo) (Adaptado Veterinary Laboratories agency's, 2009)	31
Figura 14: Percentagem de raças puras e raças cruzadas das explorações analisadas no estudo.....	51
Figura 15: Percentagem das amostras analisadas pelas diferentes raças de ovinos e caprinos, sujeitas ao estudo.	52
Figura 16: Fórmula de cálculo do número mínimo de amostras (Adaptado de Toma <i>et al.</i> , 2004).	53
Figura 17: Fórmula utilizada para obter a densidade óptica corrigida da amostra.	56
Figura 18: Fórmula utilizada para obter o “Cut Off” da técnica laboratorial utilizada.	56
Figura 19: Distribuição das explorações do Baixo Alentejo, sujeitas ao estudo, em função da seropositividade ou seronegatividade a BDV.....	59
Figura 20: Distribuição das amostras do Baixo Alentejo, sujeitas ao estudo, em função da seropositividade ou seronegatividade a BDV.....	60
Figura 21: Número de amostras seropositivas e seronegativas nas seis explorações que apresentaram resultados positivos do presente estudo.	60
Figura 22: Número de amostras seropositivas e seronegativas por cada uma das raças sujeitas ao estudo.....	61
Figura 23: Número de amostras seropositivas e seronegativas a BDV, por cada grupo de dimensões de efectivos das explorações do Baixo Alentejo, sujeitas ao estudo	63
Figura 24: Número de amostras seropositivas e seronegativas a BDV, em explorações que os animais sujeitos aos estudo coabitam com bovinos e em explorações onde habitam apenas os pequenos ruminantes sujeitos ao estudo.....	64
Figura 25: Número total de explorações sujeitas ao estudo e explorações com resultados seropositivos, por localidade no distrito de Beja.....	65
Figura 26: Distribuição Geográfica das Explorações seropositivas e seronegativas sujeitas ao estudo, no distrito de Beja.	67

Índice de Tabelas

Tabela 1: Resumo das principais características e funções das proteínas virais do BDV (Adaptado de Ridpath, 2005).	17
Tabela 2: Distribuição do número de explorações, amostras de sangue obtidas e população representada por localidade no distrito de Beja.	50
Tabela 3: Distribuição da população e amostras de sangue por espécie.	50
Tabela 4: Número de amostras obtidas por espécie e pelas raças sujeitas ao estudo.	52
Tabela 5: Distribuição das explorações do Baixo Alentejo, sujeitas ao estudo, pelos 3 diferentes tipos de amostragem.	53
Tabela 6: Classificação dos resultados das amostras.	57
Tabela 7: Análise estatística global dos resultados obtidos.	58
Tabela 8: Número de explorações seropositivas e seronegativas a BDV segundo a raça dos animais no estudo.	62
Tabela 9: Número de explorações seropositivas e seronegativas a BDV consoante o tamanho do seu efectivo.	63
Tabela 10: Número de explorações seropositivas e seronegativas a BDV, em explorações que os animais sujeitos aos estudo coabitam com bovinos e em explorações onde habitam apenas os pequenos ruminantes sujeitos ao estudo.	64
Tabela 11: Número total de explorações sujeitas ao estudo e explorações com resultados seropositivos, por localidade no distrito de Beja.	66
Tabela 12: Propriedades dos testes de diagnóstico e fórmula de cálculo dos valores preditivos (Adaptado de Almeida Filho & Rouquayrol, 1990)	68
Tabela 13: Variação dos valores preditivos consoante a prevalência assumida na população em estudo (n=197)	69

1. Introdução

A Doença das Fronteiras (“Border Disease”) é reconhecida principalmente como uma importante causa de patologia congénita em ovinos. Causada pelo vírus da Doença das Fronteiras (“Border Disease” vírus (BDV)), tem como principais sinais clínicos, fêmeas inférteis, aborto, nados mortos, borregos inviáveis, alguns dos quais apresentando tremores musculares e lã comprida e grossa. Muitos destes borregos são persistentemente infectados (PI) toda a sua vida, e, como excretam constantemente o vírus, são propagadores muito eficientes da infecção para os restantes animais. Deste modo, a “Border Disease” é uma afecção que pode causar grandes prejuízos nas explorações de pequenos ruminantes.

A capacidade do BDV produzir animais PI após infecção intra-uterina é um fenómeno biológico fascinante de interesse virológico e imunológico. O controlo da doença num rebanho consegue-se através da identificação dos animais PI e da prevenção da infecção de ovelhas durante a gestação.

Portugal é o oitavo maior produtor de ovinos na Europa. A produção de ovinos em Portugal é caracterizada por efectivos de pequena dimensão e de raças autóctones no norte do país. No centro e sul do país os efectivos são de maiores dimensões compostos por animais de raças autóctones, bem como de raças cruzadas de forma a melhorar o rendimento. A partir do ano 2000, altura em que o efectivo português de pequenos ruminantes era de 3.159.381 animais em 84.311 explorações, tem-se verificado uma diminuição no efectivo total de pequenos ruminantes, bem como no número de explorações activas. Em 2011 o número de explorações produtoras de pequenos ruminantes em Portugal era de 69.005 enquanto o efectivo de pequenos ruminantes fixou-se nos 2.476.829 animais. A região com maior número de pequenos ruminantes é o Alentejo com 1.086.865 ovinos distribuídos por 8.315 explorações. Esta diminuição do efectivo total de ovinos bem como das explorações é uma consequência da diminuição da margem de lucro e do aumento do custo de produção verificado ao longo da última década na produção de pecuária em Portugal.

Nenhuma pesquisa sobre a prevalência de BDV foi realizada em Portugal, apesar de ser de conhecimento da direcção geral de veterinária que é uma doença presente no país. Deste modo, este trabalho teve como objectivo determinar a seroprevalência de anticorpos contra a “Border Disease” em pequenos ruminantes na região do Baixo Alentejo, de forma a perceber se existe alguma variável que influencie a seroprevalência de BDV, bem como avaliar o impacto desta afecção nesta região do País

1. Revisão Bibliográfica

1.1. “Border Disease”

Os pastores da região fronteiriça entre Inglaterra e o País de Gales descreveram durante muitos anos que por vezes nasciam borregos fracos, com tremores e com lã de pouca qualidade. Foi apenas em 1959 que os investigadores do laboratório veterinário de Worcester descreveram uma afecção com estes sintomas, a que chamaram Border ou ‘B’ Disease (BD), devido a esta localização entre fronteiras (Hughes *et al.*, 1959). Nos 20 anos seguintes esta afecção foi observada na Nova Zelândia (Manktelow *et al.*, 1969), Austrália (Acland *et al.*, 1972) e Estados Unidos da América (Jackson *et al.*, 1972). Na Oceânia a afecção adoptou o nome de ‘Hairy Shaker’, derivado dos sinais clínicos que a doença provoca nos pequenos ruminantes (Nettleton & Willoughby, 2007).

Na década de 60 esta afecção foi apenas observada em duas raças de ovelhas Inglesas muito semelhantes. Deste modo, os investigadores consideravam que era de etiologia genética. Porém, à medida que se iam observando diversas raças de ovelhas com os mesmos sintomas começou a considerar-se que esta afecção teria etiologia infecciosa, o que veio a ser confirmado em 1976 por Dickinson & Barlow em Edimburgo, e por colegas em Worcester (Nettleton & Willoughby, 2007). Hoje em dia pensa-se que esta doença está presente em todos os países produtores de ovinos e caprinos (Radostits *et al.*, 2007).

1.1.1. Descrição do Agente Etiológico

2.1.1.1. Classificação e Caracterização do BDV

O vírus Border Disease (BDV) é uma das quatro espécies de pestivírus classificadas na família *Flaviviridae*. O género *Pestivirus* compreende os seguintes vírus: o BDV; o vírus da peste suína clássica (CSFV); e as duas espécies distintas do vírus da diarreia viral bovina (BVDV), BVDV-1 e BVDV-2, tal como é apresentado na Figura 1. O vírus isolado das ovelhas e cabras adquiriu o nome de BDV, o que foi isolado nos suínos recebeu a designação de CSFV, e o vírus isolado nos bovinos, o nome de BVDV (Fauquet *et al.*, 2005)

No entanto, a capacidade de transmissibilidade entre espécies tem sido demonstrada tanto natural como experimentalmente (Paton *et al.*, 1995; Vilcek & Nettleton, 2006). Por exemplo o BVDV também infecta ovinos, caprinos, ruminantes selvagens e suínos (Becher *et al.*, 1997). O BVDV-1 foi detectado em ovinos na Alemanha, Suécia, Reino Unido e Estados Unidos (Becher *et al.*, 1995; Vilcek *et al.*, 1997; Willoughby *et al.*, 2006) e BVDV-2 foi também detectado em ovinos na Alemanha, Reino Unido e os EUA (Becher *et al.*, 1995;

Sullivan, *et al.*, 1997; Vilcek *et al.*, 1997). Por outro lado, o CSFV nunca foi isolado a partir de ruminantes naturalmente infectados, apesar de um estudo experimental ter mostrado que estes são susceptíveis ao CSFV (Dahle *et al.*, 1987).

Embora o BVDV seja comum em ovinos, há muito pouca evidência de infecção natural de BDV em bovinos. Recentemente, um caso de BDV em bovinos foi identificado durante testes de rotina na Áustria como parte do seu programa de controlo de BVDV (Hornberg *et al.*, 2009), e no Reino Unido foram encontrados seis casos de BDV em bovinos (Strong *et al.*, 2010). Através de modernas técnicas de análises antigénicas e genéticas, já se isolou BDV em renas, bisonte europeu e cervídeos (Nettleton *et al.*, 2008).

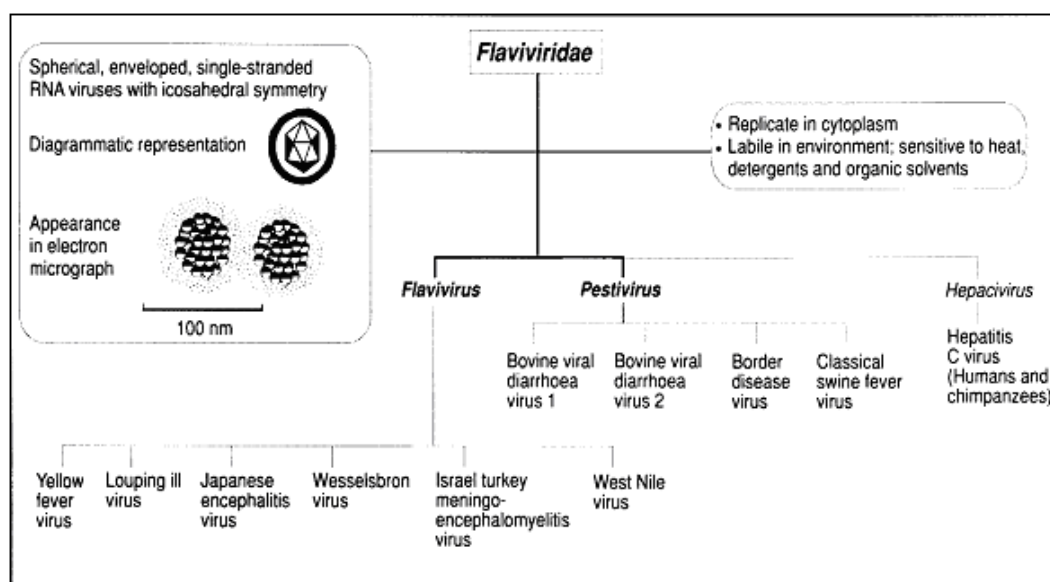


Figura 1: Vírus da família *Flaviviridae* com relevância em medicina veterinária (Adaptado de Quinn *et al.*, 2003).

Os pestivírus podem ser classificados em dois biótipos consoante a sua capacidade de produzir citopatogenia em culturas celulares: citopatogénico (CP) ou não-citopatogénico (NCP). A grande maioria dos vírus encontrados na natureza são NCP (Deregt & Loewen, 1995).

O pestivírus é um vírus com envelope, constituído por partículas esféricas com diâmetro aproximadamente de 46 nm e com um núcleo de 20-25 nm (Figura 2 e Figura 3). O seu genoma é composto por uma cadeia RNA simples, positiva com 12.3-12.5 kbp de tamanho (cerca de 12500 nucleótidos). Pode ser dividido em três distintas partes: a região não tradutora 5'; uma longa *open reading frame* (ORF) que codifica uma poliproteína com 4000 aminoácidos; e a região não tradutora 3' (Becher *et al.*, 1998; Ridpath & Bolin, 1997).

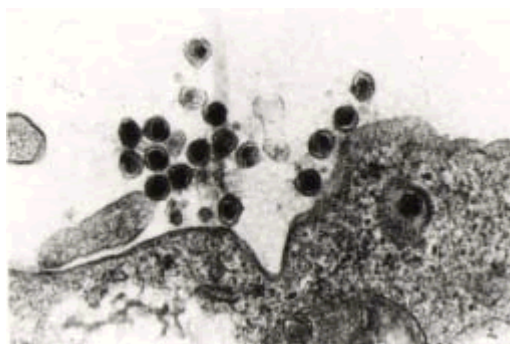


Figura 2: Imagem microscópica de pestivírus (Adaptado de Syva, 2005).

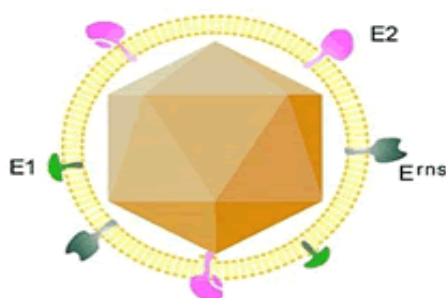


Figura 3: Esquema ilustrativo de um pestivírus com as proteínas estruturais E1, E2 e E^{ms} (Adaptado de Syva, 2005).

2.1.1.2. Poliproteína Viral

A poliproteína codificada pelo vírus é originada por um conjunto de proteínas individuais sendo elas por ordem: N^{pro}; C; E^{ms}; E1; E2; P7; NS2-3; NS4A; NS4B; NS5A; e NS5B. Estas podem ser divididas em proteínas estruturais (C, E^{ms}, E1, E2) e proteínas não estruturais (N^{pro}, NS2-3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) como mostra o diagrama da Figura 4 (Vilcek *et al.*, 1994).

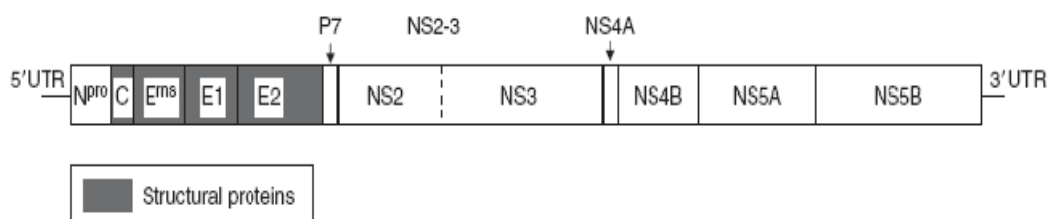


Figura 4: Diagrama representativo do conjunto das proteínas estruturais e não estruturais que fazem parte da poliproteína codificada pelos pestivírus (Adaptado de Aitken, 2007).

A N^{pro} e E^{ms} são proteínas exclusivas dos pestivírus, não sendo encontradas em mais nenhum vírus da família *Flaviviridae*. Porém, são diferentes para cada tipo de pestivírus o que as torna úteis para distinguir os vários tipos de pestivírus em isolados (Nettleton &

Willoughby, 2008). A N^{pro} compromete a resposta imune do hospedeiro, uma vez que apresenta antagonismo ao interferon, e a E^{ms} compõe a partícula viral e participa também na inibição da expressão do interferon (Gil *et al.*, 2006; Schweizer *et al.*, 2006). A N^{pro} é crucial para a formação e manutenção dos animais permanentemente infectados (PI) uma vez que esta possui proteases que permitem que esta se desagregue da poliproteína (Nettleton *et al.*, 2008).

A proteína C é a proteína da cápside (Nettleton & Willoughby, 2008).

A glicoproteína E2 está exposta na superfície da partícula viral e induz a formação de anticorpos neutralizantes por parte do hospedeiro. É a proteína mais variável entre os pestivírus, pelo que também é utilizada para distinguir pestivírus em isolados laboratoriais (Chase *et al.*, 2004).

A proteína NS2-3 tem um papel fundamental na citopatogenicidade e na sobrevivência do vírus. A NS2-3 é característica do vírus não citopático. Porém, alguns subtipos de BDV possuem uma protease que permite separar a proteína em NS2 e NS3 tornando o vírus em citopático. Grandes quantidades de NS3 resultam em morte celular e a longo prazo na morte do hospedeiro. Em relação às restantes proteínas as suas funções estão relacionadas com a replicação viral (Nettleton *et al.*, 2008).

Tabela 1: Resumo das principais características e funções das proteínas virais do BDV (Adaptado de Ridpath, 2005).

Proteína viral	Tamanho (K Dalton)	Características	Funções
N ^{pro}	20	Não estrutural	Autoproteólise Não é necessária para a replicação do RNA
E ^{ms}	40	Estrutural	Glicoproteína associada ao envelope Actividade ribonuclease
C	14	Estrutural	Forma a nucleocápside do virião
E1	25	Estrutural	Glicoproteína associada ao envelope Proteína integral de membrana
E2	53	Estrutural	Glicoproteína associada ao envelope Proteína integral de membrana Proteína estrutural imunodominante
P7	7	Não estrutural	Função desconhecida Necessária para produzir vírus infeccioso mas não para a replicação de RNA
NS2/3	125	Não estrutural.	NS2 tem um domínio de zinco
NS2	54	No biótipo citopatogénico NS2/3 é clivada em NS2 e NS3.	NS2/3 e NS3 contêm RNA helicase e domínios serina protease N-terminal; sofre autoclivagem e permanece como proteína não estrutural da poliproteína viral Proteína não estrutural imunodominante
NS3	80		
NS4A	7.2	Não estrutural	Cofactor da serina protease
NS4B	38	Não estrutural	Componente da replicase
NS5A	55	Não estrutural	Componente da replicase
NS5B	81	Não estrutural	Actividade RNA polimerase

2.1.1.3. Replicação Viral

A replicação do RNA dá-se no citoplasma da célula hospedeira. As partículas virais são agregadas e envolvidas em membranas intracelulares, transportadas em vesículas citoplasmáticas pelo percurso secretor, sendo libertadas por exocitose. A replicação do RNA ocorre, tal como em outros flavivírus, através do complexo de replicação, composto pelo RNA viral e proteínas virais não estruturais, em associação com as membranas intracitoplasmáticas (Figura 5) (Ridpath, 2005):

- A penetração de vírus com envelope nas células hospedeiras envolve as etapas de ligação de proteínas virais de superfície E^{ms} e E2 a receptores celulares e, em seguida, a penetração por fusão do envelope com a membrana plasmática. Os pestivírus penetram nas células hospedeiras após fusão do envelope com a membrana do lisossoma, com pH levemente acidificado (Lecot *et al.*, 2005).
- Uma vez dentro da célula ocorre a descapsidação onde o RNA é libertado para o citoplasma onde ocorre a tradução do material genético. Após a tradução é formada uma poliproteína clivada por enzimas celulares e virais, dando início à replicação. O novo material genético é então encapsulado e levado ao retículo endoplasmático para a maturação dos viriões. Após esta etapa os viriões maduros são libertados da célula hospedeira por exocitose (Leyssen *et al.*, 2000).

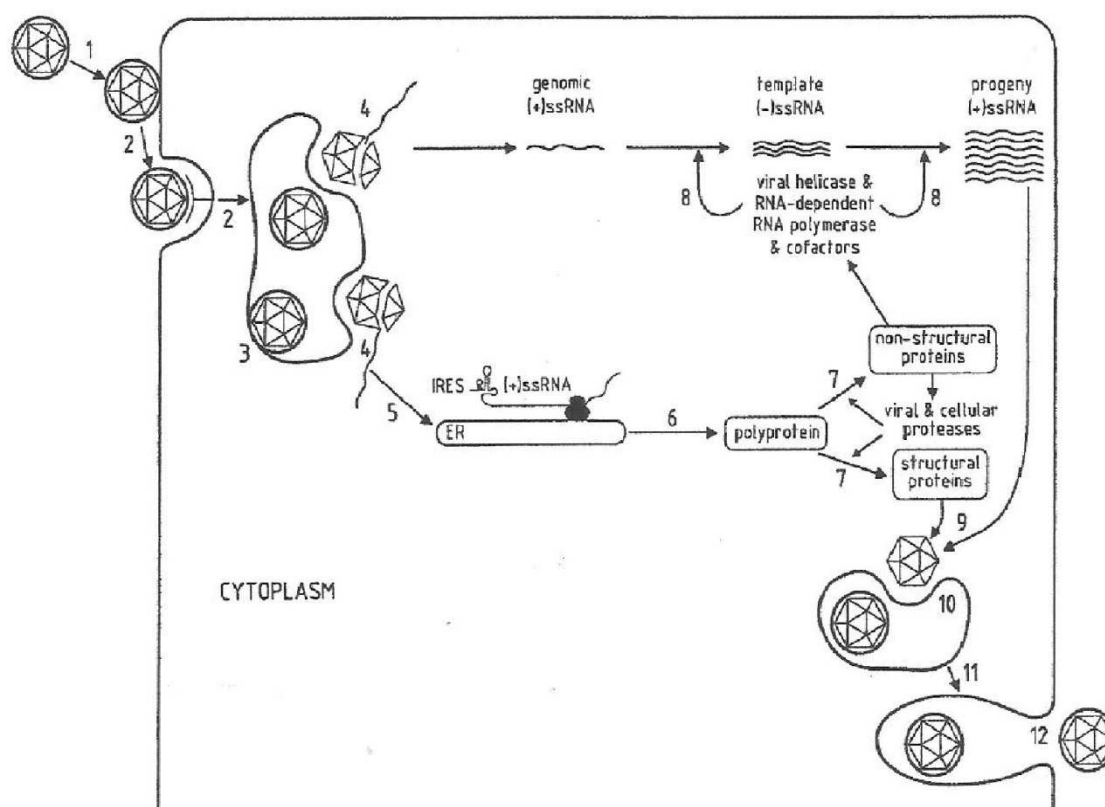


Figura 5: Ciclo de replicação viral dos pestivírus: 1, adsorção; 2, endocitose; 3, fusão com lisossomas; 4, descapsidação; 5 e 6 tradução; 7 formação da poliproteína viral; 8, replicação; 9, encapsidação; 10 e 11, organização; 12, libertação dos viriões. (Adaptado de Leyssen *et al.*, 2000).

2.1.1.4. Grupos Filogenéticos de BDV

Para classificar o BDV em diferentes grupos realizam-se estudos filogenéticos, sendo mais comum utilizar as sequências da região 5'UTR, e as proteínas N^{pro} ou E2 (Vilcek *et al.*, 1994). Deste modo, o BDV está dividido em seis distintos grupos filogenéticos: BDV-1, que foi detectado em ovinos nos EUA (Sullivan *et al.*, 1997), Reino Unido (Vilcek *et al.*, 1997), Austrália (Becher *et al.*, 1994) e Nova Zelândia (Vilcek *et al.*, 1998); BDV-2 em ruminantes na Alemanha (Becher *et al.*, 2003); BDV-3 na Suíça (Stalder *et al.*, 2005) e Áustria (Krametter-Froetscher *et al.*, 2007); BDV-4 em Espanha (Arnal *et al.*, 2004; Valdazo-Gonzalez *et al.*, 2007) e BDV-5 e BDV-6 em França (Dubois *et al.*, 2008). Isolados de BDV na Turquia são possivelmente um novo grupo, porém é necessário realizar ainda uma caracterização completa do mesmo (Oguzoglu *et al.*, 2009). Recentemente foi ainda descoberto um BDV em Itália diferente de todos os restantes, que poderá ser outro novo grupo (Giammarioli *et al.*, 2011). Em Portugal, até a data, na Direcção Geral de Veterinária, não existem registos de isolamento de qualquer tipo de BDV.

2.1.2. Epidemiologia

A “Border Disease” está presente em todos os países produtores de ovinos e caprinos (Radostits *et al.*, 2007).

Uma das razões para esta incidência é o facto de o BDV ter a capacidade de formar animais persistentemente infectados (PI). Os PI's são animais infectados pelo vírus *in utero*, num período em que seu organismo reconhece o vírus como uma estrutura própria e não como um antigénio externo. Desta forma, nascem infectados mas não produzem anticorpos contra ele. Esses animais apresentam alta capacidade de excreção do vírus e são os maiores responsáveis pela manutenção da doença no rebanho, devendo ser identificados e eliminados. São geralmente animais fracos, com um crescimento mais lento em relação aos da sua faixa etária (Deregt & Loewen, 1995).

As ovelhas podem contrair “Border Disease” não só através do BDV mas também dos restantes pestivírus, principalmente através dos bovinos e dos suínos (Nettleton *et al.*, 2008). Porém, os bovinos são considerados a maior ameaça, uma vez que são os maiores reservatórios de pestivírus mundial. É estimado que 70% dos bovinos adultos do mundo possui anticorpos contra BVDV (Carlsson, 1991).

A maioria dos estudos sobre a seroprevalência de BDV revela as seguintes conclusões:

- O BDV tem menor incidência em ovelhas e cabras do que o BVDV em bovinos;
- O número de animais positivos é influenciado pela região em que está inserido o rebanho;
- A seroprevalência é influenciada pela idade dos animais.

Assim, a média da percentagem em rebanhos varia entre os 5% e os 50% de animais positivos, onde a maior prevalência ocorre nas fêmeas mais velhas do rebanho. Um rebanho com animais PI tem um maior número de seropositivos, mas também é normal encontrar animais seronegativos nestes rebanhos (Berriatua *et al.*, 2004). Em rebanhos de extensivo estão descritos casos de transmissão por parte de animais silvestres, nomeadamente de veados (Nettleton *et al.*, 2008).

A transmissão do BDV ocorre tanto horizontal como verticalmente. Fêmeas gestantes infectadas transmitem o vírus aos fetos por via transplacentária, podendo deste modo gerar animais PI que irão por sua vez excretar abundantemente o vírus, transmitindo-o aos restantes animais do rebanho por contacto directo (Bonniwell *et al.*, 1987; Smith, 2009).

Os borregos PI podem por vezes atingir maturidade sexual, porém têm fertilidade reduzida (Nettleton *et al.*, 2007).

As principais vias de excreção são secreções nasais, fomites, saliva, urina e fezes (Bonniwell *et al.*, 1987; Smith, 2009). Os carneiros podem também transmitir o vírus através do sémen (Nettleton *et al.*, 2007).

É na altura do acasalamento que ocorre o maior número de infecções, não só por transmissão venérea mas também porque muitas vezes o rebanho é acondicionado de forma a facilitar o maneio da exploração, ocorrendo assim também infecções por contacto directo e fomites. Em rebanhos positivos as fêmeas que já estiveram em virémia e que consequentemente produziram anticorpos, são imunes a futuras exposições à mesma estirpe de BDV (Khan, 2005; Nettleton *et al.*, 2007).

Após um surto de Border Disease os animais com maior risco de infecção são as fêmeas de substituição, bem como os animais que provêm de explorações que nunca contactaram com o vírus, podendo ocorrer assim casos esporádicos da doença (Nettleton *et al.*, 2007).

2.1.3. Patogenia

2.1.3.1. Patogenia em Ovelhas não Gestantes

As infecções agudas de Border Disease em borregos *post* natal e em adultos são caracterizadas por uma virémia subclínica de curta duração. O vírus é transmitido por via oro-nasal, tem tropismo para leucócitos e é detectado no soro entre os dias 4 a 11 pós infecção. Após o curto período de virémia são detectados anticorpos neutralizantes no soro aproximadamente 11 a 14 dias após infecção, período que coincide com a eliminação do vírus. Os sintomas observados neste tipo de infecção são depressão, febre e leucopénia (Radostits *et al.*, 2007; Nettleton *et al.*, 2007). Estudos de inoculação de BDV em borregos saudáveis resultaram numa infecção moderada e transitória em que houve uma pequena redução do crescimento não tendo sido registadas quaisquer alterações macro e microscópicas (Radostits *et al.*, 2007).

Estão descritos casos de sintomatologia severa em ovinos que sofreram infecções agudas de BDV. Estes casos serão desenvolvidos no capítulo dos sinais clínicos.

2.1.3.2. Patogenia em Ovelhas Gestantes

As infecções mais severas registadas de Border Disease ocorrem em ovelhas gestantes (Nettleton *et al.*, 2004). Após a infecção o vírus invade a placenta causando uma placentite necrosante aguda (Radostits *et al.*, 2007), detectável 10 dias após a infecção. No caso de ser uma infecção severa a placentite é suficiente para causar morte embrionária ou até mesmo aborto (Sargison, 2008). No caso de a gestação se manter as lesões desaparecem 25 dias após a infecção. Como consequência da infecção placentária, caso não tenha resultado já em aborto, o vírus infecta o feto aproximadamente 1 semana após a infecção. A resposta imunitária materna não tem qualquer influência na resposta imunitária do feto (Nettleton *et al.*, 2004). O resultado da infecção de BDV no feto poderá ser: reabsorção embrionária; aborto; nados mortos; borregos com mal formações; borregos com problemas neurológicos; borregos pequenos e inviáveis imunologicamente; ou borregos normais sem nenhum sinal clínico (Figura 7) (Radostits *et al.*, 2007). A extensão do dano fetal é influenciada por inúmeros factores como a idade do feto, a estirpe e a carga viral, a raça do animal e a capacidade de resposta imunológica do feto. O factor mais importante é a idade do feto, uma vez que a capacidade imunológica fetal se desenvolve apenas aproximadamente entre os dias 60-61 e 80-85 de gestação (Hussin & Woldehiwet, 1994). Deste modo, a fase de gestação em que ocorre a infecção será determinante para a expressão que o BDV terá no feto (Figura 6).

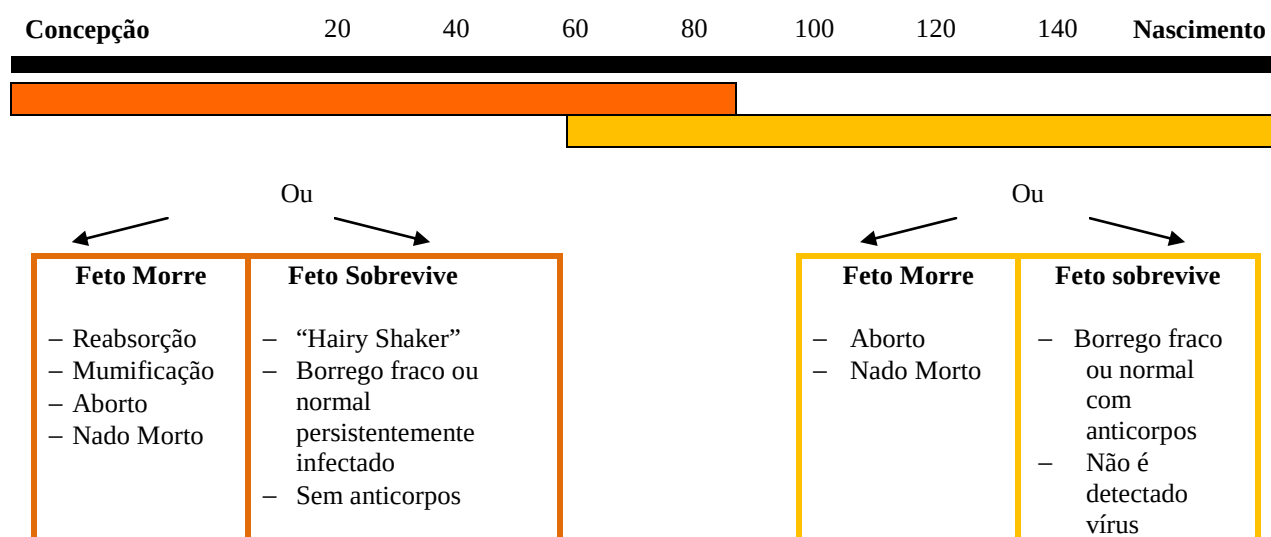


Figura 6: Esquema ilustrativo dos vários cenários possíveis de infecções de BDV antes e depois dos fetos adquirirem imunidade entre o 60º e o 85º dia de gestação (Adaptado de Nettleton *et al.*, 2007).

2.1.3.2.1. Infecção Materna Antes do 60º Dia de Gestação

Quando ocorre uma infecção nos primeiros dois meses de gestação o vírus pode atravessar a placenta e replicar-se nas células fetais. Devido ao feto não possuir qualquer tipo de defesa imunológica, a morte fetal é o resultado mais comum nesta fase, não sendo observados, na maior parte dos casos, sinais clínicos de aborto por parte do proprietário uma vez que ocorre absorção embrionária. Estas ovelhas só serão identificadas como não gestantes na altura prevista do parto caso não esteja implementado na exploração métodos de diagnóstico de gestação (Sargion, 2008). Estudos em que são infectados fetos experimentalmente neste período de gestação concluem que a taxa de mortalidade varia entre os 50% e os 75% (Nettleton *et al.*, 2004).

Fetos que sobrevivam a uma infecção nesta fase de gestação serão animais persistentemente infectados (PI) (Roeder *et al.*, 1987). A imunidade humoral para combater outros patógenos é normal. O mesmo não acontece com a imunidade celular, uma vez que a função linfocitária fica comprometida com redução do número de células T (Sawyer *et al.*, 1992). Assim, normalmente animais PI ficam infectados por outra afecção, acabando muitos por morrer, por volta dos três meses de idade, altura em que já não estão presentes anticorpos maternos no seu organismo. Os animais PI's ficam a excretar o vírus para o resto do rebanho até acabarem por morrer (Sargion, 2008). Os mecanismos envolvidos na manutenção do equilíbrio entre o vírus e animais PI ainda não são totalmente compreendidos, porém é necessário que a infecção tenha como etiologia uma estirpe do vírus não citopático. Este equilíbrio pode por vezes ser instável em alguns animais PI uma vez que em certos casos estes manifestam diarreias persistentes, corrimentos nasais e oculares, pneumonias, enterites, miocardites e nefrites, acabando por morrer. Isolados do intestino confirmam a presença de BDV citopático que deriva do vírus não citopático já presente no próprio animal e não de uma fonte externa, uma vez que nem todos os animais PI da exploração manifestam estes quadros agudos. Este equilíbrio pode durar anos uma vez que há casos de animais PI que viveram 5 anos de idade (Nettleton *et al.*, 1992).

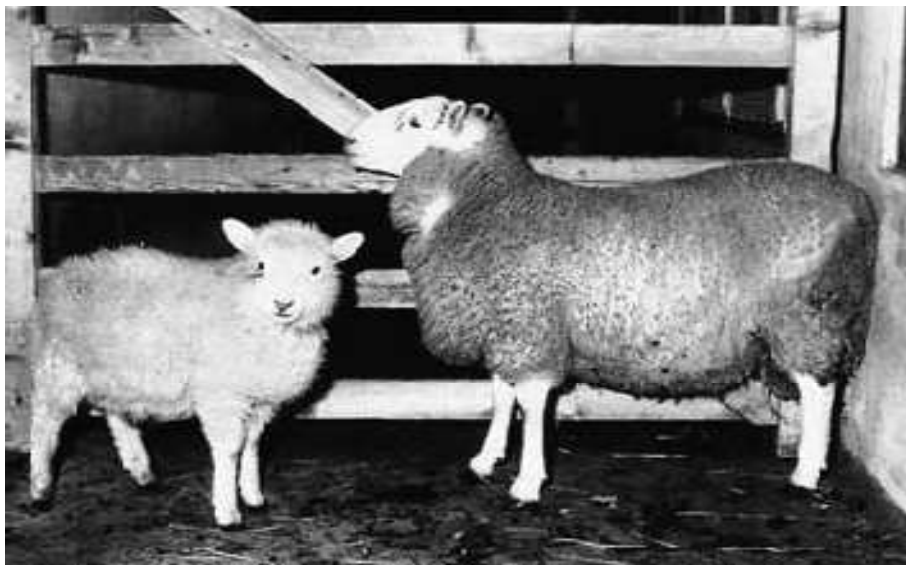


Figura 7: Borregos da raça Cheviot com 7 meses de idade, ambos persistentemente infectados com BDV. Enquanto um apresenta aparência e tamanho normal para a idade o outro é bastante atrofiado. As infecções ocorreram no mesmo estágio de gestação e com o mesmo tipo de vírus (Adaptado de Nettleton *et al.*, 2007).

Animais que nascem PI podem apresentar algumas alterações congénitas, sendo as mais comuns a nível da tiróide, da pele e do sistema nervoso central (SNC), não ocorrendo nenhuma reacção inflamatória como nos casos de infecções agudas com BDV citopático.

- Nos PI's com alterações neurológicas ocorre uma hipomielinização generalizada pelo SNC em que além da deficiência de mielina também se verifica um aumento da densidade de células de glia (Nettleton *et al.*, 2007). A maioria dos borregos afectados demonstra disfunção neurológica à nascença que varia desde ligeiros tremores até contracções tónicas e clónicas dos músculos esqueléticos do corpo e da cabeça, resultando assim o nome de “Shakers”. Estas alterações desaparecem por volta dos 6 meses de idade (Jeffrey & Roeder 1987). Estas lesões do SNC ocorrem por acção directa do vírus nas células precursoras de oligodendrócitos, não permitindo assim a maturação destas células que são responsáveis pela formação e manutenção das bainhas de mielina do SNC (Barlow & Patterson, 1982; Caffrey *et al.*, 1997).
- Outra causa de défice de mielina é a diminuição de secreção das hormonas da tiróide T3 e T4, uma vez que a enzima (2,3-cyclic nucleotide-3-phosphodiesterase) associada a uma normal mielinização depende directamente da concentração das hormonas da tiróide. Esta diminuição de T3 e T4 é consequente de uma deficiência a nível da glândula tiróide pois a glândula pituitária dos animais afectados não possui

qualquer alteração (Anderson *et al.*, 1987; Sawyer *et al.*, 1992; Smith, 2009). A diminuição destas hormonas origina também o baixo peso que estes animais costumam apresentar em relação a animais da mesma idade não infectados (Radostits *et al.*, 2007).

- Outra alteração verificada em animais PI é anomalias do pêlo que derivam de um aumento do tamanho dos folículos primários e duma redução do número de folículos secundários (Radostits *et al.*, 2007). Estas alterações resultam num aumento do número de fibras grossas em relação ao número de fibras finas. Como resultado destas alterações os borregos têm um pêlo grosso, comprido e moldável e daí resulta o nome de “Hairy”. Apesar do pêlo ir retomando o tamanho e a forma normal à medida que o borrego cresce, biopsias da pele confirmam que as alterações registadas nos folículos são permanentes (Nettleton *et al.*, 2004). Estas alterações, são mais visíveis em raças de ovinos de lã fina ou média e menos evidente nas raças de lã grossa, onde as alterações são mais demarcadas e visíveis na nuca. Em alguns casos estas alterações podem ser difíceis de diferenciar, devido às diferenças do crescimento do pêlo entre as variadas raças e diferenças de idade (Barlow *et al.*, 1982).
- Por vezes borregos PI apresentam anomalias de conformação e de crescimento. Deste modo, verifica-se que estes animais possuem um encurtamento nos ossos longos, bem como no comprimento crânio-caudal corporal, dando deste modo um aspecto compacto e curto. Em ossos longos há evidência de crescimento de acidentes ósseos anormais e osteogénese descontrolada (Caffrey *et al.*, 1997).

Alguns borregos PI's podem nascer sem alterações de conformação, de pêlo e a nível do SNC o que é um factor limitante para a identificação de animais PI's nas explorações. A ausência de sinais clínicos não descarta a possibilidade da existência de animais PI e de a exploração ser indemne de Border Disease (Radostits *et al.*, 2007).

2.1.3.2.2. Infecção entre o 60º dia e o 85º dia de gestação

Quando a infecção fetal ocorre entre o dia 60 e 85 de gestação, altura em que a imunidade fetal se está a desenvolver, o resultado é variável (Nettleton *et al.*, 2007; Radostits

et al., 2007; Smith, 2009). Alguns animais nascem com anticorpos contra BDV e não é detectado vírus em circulação, enquanto outros nascem PI, ou seja, virémicos e sem anticorpos (Nettleton *et al.*, 2004). Infecções neste estágio de gestação podem provocar severas reacções inflamatórias no SNC com inflamação, necrose e periarterite das camadas germinativas do cérebro (Radostits *et al.*, 2007; Nettleton *et al.*, 2007), resultando em lesões como hidroanencefalia, hipoplasia e/ou aplasia cerebelar e encefalomalácia. Estes borregos demonstram sinais clínicos nervosos graves, distúrbios comportamentais e locomotores mais severos que os animais infectados previamente aos 60 dias de gestação (Roeder *et al.*, 1987; Nettleton *et al.*, 1992; Jeffery *et al.*, 1987). As lesões a nível do SNC têm origem numa resposta auto-imune e os borregos que as manifestam são maioritariamente animais com grandes quantidades de anticorpos anti BDV (Nettleton *et al.*, 2004). Por vezes alguns borregos também apresentam anomalias esqueléticas, como membros excessivamente compridos e artrogripose.

2.1.3.2.3. Infecção depois do 85º dia de gestação

As infecções que ocorrem depois do dia 85 de gestação são maioritariamente controladas e eliminadas pela resposta imunitária do feto (Radostits *et al.*, 2007). Morte fetal é rara, e a maioria dos borregos são de aparência normal, sem sinais clínicos e apresentam anticorpos contra BDV. Porém, microscopicamente é possível encontrar lesões a nível do SNC, como periarterites nodulares originadas por reacções auto-imunes. Estas lesões podem durar até ao primeiro ano de vida do animal (Nettleton *et al.*, 2004).

2.1.4. Sinais clínicos

2.1.4.1. Sinais clínicos em ovinos adultos

Em ovinos adultos os sinais clínicos mais evidentes ocorrem em fêmeas gestantes. Assim, é comum num rebanho infectado verificar-se abortos (Figura 8), reabsorções embrionárias e fetos mumificados (Nettleton *et al.*, 2004). Os restantes animais adultos manifestam uma virémia durante 2 a 12 dias após a infecção, caracterizada por uma febre ligeira a moderada ($\leq 40,5^{\circ}\text{C}$), acompanhada por uma ligeira leucopénia ($3000 \text{ leucócitos/mm}^3$ [valor padrão entre 5000 a $11000 \text{ leucócitos/mm}^3$ (Scott *et al.*, 2006)]) (García-Pérez *et al.*, 2008; Radostits *et al.*, 2007). Nos machos pode ser verificado uma diminuição do diâmetro testicular bem como um amolecimento da sua consistência (Nettleton *et al.*, 2007). Verifica-se uma seroconversão nos animais entre os dias 23 e 38 após a infecção, sendo produzidos anticorpos anti BDV (Krametter-Froetscher *et al.*, 2010).

Casos de infecções agudas com sinais clínicos severos foram descritos em França, Holanda e Tunísia onde os animais apresentavam leucopénia severa, enterites hemorrágicas, pneumonias fibrinosas e febres altas (Nettleton *et al.*, 2007):

- Foram descritas em França manifestações severas de BD, devido a uma estirpe rara do vírus que causou leucopénia severa e a morte a 50% dos borregos de 3-5 meses de idade. Esta afecção atípica foi reportada em Dezembro de 1983, na região de Aveyron, numa exploração intensiva de ovinos leiteiros. No ano de 1984 esta estirpe de BDV causou a morte a 1500 ovelhas e a 24000 borregos. Os sintomas verificados em animais afectados eram depressão severa, febres altas, diarreia e leucopénia. Na necrópsia observou-se hemorragias no ceco, cólon e linfonodos mesentéricos. As ovelhas que sobreviveram ao surto tiveram borregos fracos, inviáveis e alguns apresentavam tremores musculares. A incidência desta afecção diminuiu bastante em 1985 e foi diminuindo ao longo do tempo nunca tendo sido concluída qual a origem exacta deste síndrome. No total foram isolados 5 agentes virais mas esta estirpe de BDV (que recebeu o nome AV2) foi considerada o principal agente etiológico deste síndrome. (Chappuis *et al.*, 1984; Nettleton *et al.*, 2004).
- Outro caso de manifestação clínica de BD teve origem na aplicação de vacinas vivas, contra a cólera suína, criadas a partir de células de ovinos contaminadas com BDV. Os borregos foram vacinados durante um surto desta doença na Holanda e manifestaram lesões entéricas hemorrágicas, pneumonia fibrinosa, febre, leucopénia, anorexia, conjuntivite, descargas nasais, dispneia, diarreia e morte (Wensvoort & Terpstra, 1988; Nettleton *et al.*, 2007).
- Em 1995 após uma campanha de vacinação contra a varíola ovina num rebanho na Tunísia, os ovinos manifestaram sinais clínicos típicos de “Border Disease” como abortos em grandes percentagens, nados mortos, borregos fracos e borregos “hairy shaker”. A origem do surto deveu-se ao facto de a vacina viva modificada ter sido produzida a partir de células de ovinos contaminadas. Foi confirmado que 11 dos 14 lotes das vacinas contra a varíola ovina, disponíveis naquele país, estavam contaminadas com BDV (Russo *et al.*, 1999).

Porém, estes quadros agudos são bastante raros numa infecção natural de BDV (Nettleton *et al.*, 2004; Nettleton *et al.*, 2007).



Figura 8: Feto abortado devido a uma infecção de Border Disease (Adaptado de Babak, 2007)

2.1.4.2. Sinais Clínicos em Neonatos

Os sinais clínicos de “Border Disease” manifestam-se em animais recém-nascidos, infectados durante os primeiros 85 dias de gestação. A grande maioria dos fetos infectados nesta fase morre derivado da replicação viral que ocorre na maioria dos órgãos fetais ou derivado da placentite necrosante aguda. Deste modo, é normal verificar num surto de BDV abortos, reabsorções embrionárias, fetos mumificados ou nados mortos (Radostits *et al.*, 2007). No caso de fetos infectados nesta fase resistirem à infecção poderão manifestar um conjunto de sinais típicos dos borregos “hairy shakers” que consistem em alterações de conformação, crescimento e imunocompetência, tipo de pêlo e alterações neurológicas (García-Pérez *et al.*, 2008):

- Borregos com alterações de conformação normalmente são animais pequenos, fracos e desproporcionais (Nettleton *et al.*, 2007). Apresentam articulações severamente rígidas e fixas, que dificultam os movimentos de flexão (artrogripose) e articulações lateralizadas (Figura 9), encurtamento da maxila (braquignatismo) e uma diminuição do comprimento da mandíbula (prognatismo) verificados na figura 10. Manifestam também encurtamento dos ossos longos e do comprimento crânio-caudal do corpo (García-Pérez *et al.*, 2008). Em alguns casos, foram registados alterações dentárias, apresentando um atraso na erupção dos incisivos e uma pigmentação bem visível (Nettleton *et al.*, 2007).



Figura 9: Borrego infectado com Border Disease em que apresenta artrogrípse e articulação lateralizada. (Adaptado de García-Pérez *et al.*, 2008).



Figura 10: Borregos infectados com Border Disease em que um apresenta prognatismo e o outro braquignatismo. (Adaptado de García-Pérez *et al.*, 2008).

- O peso à nascença bem como o crescimento diário de borregos infectados *in útero* é bastante menor do que em borregos saudáveis. Estes borregos são maioritariamente inviáveis (Figura 11) (Radostits *et al.*, 2007). A imunossupressão deriva do tropismo linfocitário dos pestivírus levando a uma diminuição do número de células T e B circulantes em PÍ's. Deste modo, a BD aumenta a susceptibilidade dos hospedeiros a infecções secundárias (Serkal *et al.*, 2010). Há casos de PÍ's que sobrevivem a este estado de debilitação, devido a acompanhamento dos proprietários e do médico veterinário. Nestes casos os borregos atingem a maturidade sexual mais tarde do que animais saudáveis. No caso dos machos que são submetidos a um exame andrológico, registam evidentes resultados negativos uma vez que a qualidade do sémen é alterada (Radostits *et al.*, 2007).



Figura 11: Borrego infectado com Border Disease (primeiro plano) comparado com borrego saudável (segundo plano) (Adaptado de Babak, 2007).

- As alterações do pêlo não estão presentes em todos os casos (García-Pérez *et al.*, 2008). O pêlo em animais PI's poderá ser áspero, denso, direito e alongado, onde apresenta uma anormal pigmentação (Campbell *et al.*, 1995). Esta hiperpigmentação é mais visível na zona da nuca, com zonas mais escuras que o resto do corpo como é possível verificar na figura 12 (Smith, 2009).



Figura 12: Borrego infectado com Border Disease com os sinais típicos de alteração de pêlo: Aumento do tamanho e hiperpigmentação do pêlo (Adaptado de Gates, 1994).

- Disfunções neurológicas são também sinais clínicos comuns em borregos PI com Border Disease. Animais afectados sofrem de ataxia, não conseguindo elevar-se do chão ou mesmo manter-se de pé. Quando o conseguem apresentam uma posição anormal (Sargison, 2009). Estes sinais muitas das vezes levam a que animais PI não

consigam mamar (Radostits *et al.* 2007). Também é normal nestes animais ocorrerem tremores involuntários que variam desde contracções severas dos músculos dos membros e do abdómen, a ligeiros tremores das orelhas, cabeça e cauda (Nettleton *et al.*, 2004). Estes tremores estão ausentes durante o sono e vão desaparecendo com a idade, excepto em casos de situações de stress elevado (Smith, 2009). Não se registaram casos de paralisias (Radostits *et al.*, 2007).

- Anomalias comportamentais e visuais também são visíveis em alguns borregos. Deste modo, é possível encontrar animais com movimentos circulares (circling), movimentos contra paredes e objectos (head pressing), incoordenação severa, cegueira, nistagmus e anomalias nos movimentos. Estes sinais clínicos derivam de lesões como hidranencefalia e aplasia cerebelar (Figura 13). Nestes casos os borregos apresentam membros longos e arqueados, crânios achatados e uma caixa torácica pouco compacta (Radostits *et al.*, 2007; Nettleton *et al.*, 2007; Smith, 2009).

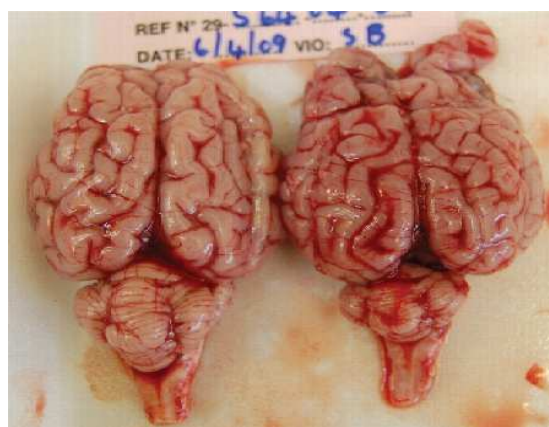


Figura 13: Cérebro com hipoplasia cerebelar (direito) dum animal infectado com BD em comparação com um Cérebro de borrego normal (esquerdo) (Adaptado Veterinary Laboratories agency's, 2009).

Outros achados clínicos menos consistentes que poderão estar presentes num quadro de Border Disease são icterícia, hidronefrose e quistos cerebrais (García-Pérez *et al.*, 2008).

Todos os sinais clínicos acima descritos na maioria dos casos não estão presentes em conjunto. Os sinais clínicos mais comuns detectados durante um surto de BD são borregos PI's fracos, com ganhos médios diários e crescimento muito abaixo dos restantes borregos saudáveis (Nettleton *et al.*, 2007).

2.1.5. Diagnóstico Diferencial

A confirmação do diagnóstico através de meios laboratoriais é aconselhável devido a outras afecções que podem ser consideradas como diagnósticos diferenciais. Num quadro de infecção de BDV deve-se ter em conta outras afecções que causem alterações neurológicas e/ou comportamentais em neonatos, bem como problemas reprodutivos nos adultos (Nettleton *et al.*, 2008). Em borregos afectados é necessário diferenciar BDV de Ataxia enzoótica (deficiência em cobre), Meningoencefalite bacteriana, Poliencefalomalácia (deficiência em tiamina), “Daft lamb Disease” (afecção genética), “Akabane Disease” (afecção viral que causa defeitos congénitos em neonatos), bem como outras infecções virais que causem alterações teratogénicas (Nettleton *et al.*, 2008; Kahn, 2005, Scott, 2007). No caso de problemas reprodutivos no efectivo é necessário diferenciar BDV de outras afecções que possam causar este tipo de problemas, como Brucelose, Febre Q, Toxoplasmose, Leptospirose, Clamidiose, e Listeriose (Nettleton *et al.*, 2008; Kahn, 2005; Radostits *et al.*, 2007).

2.1.5.1. Ataxia enzoótica

A ataxia enzoótica afecta pequenos ruminantes neonatos e tem como sinais clínicos tremores nos membros posteriores e, com menor intensidade, nos anteriores, paralisia, incapacidade de locomoção e morte. Estes sintomas derivam de uma desmielinização do sistema nervoso central que pode ocorrer *in útero* ou nos primeiros dias de vida do animal. Ao contrário da “Border Disease” esta afecção não tem etiologia infecciosa mas numa carência de cobre que tem um papel fundamental na formação de mielina (Underwood & Suttle, 1999). Na ataxia enzoótica não estão presentes sinais clínicos como alterações de pêlo e articulares e não são registados abortos como num surto de “Border Disease”. A ausência de lesões microscópicas e o baixo teor de cobre hepático torna o diagnóstico mais claro (Radostits *et al.*, 2007).

2.1.5.2. Meningoencefalite

A meningoencefalite bacteriana é a mais comum mas também pode ter origem fúngica, parasitária, idiopática e imuno mediada. Apresenta sinais clínicos de espasmos musculares, rigidez do pescoço, febre, incapacidade de estar em pé, ausência de reflexo de sucção e depressão (Kahn, 2005). Não são verificados abortos como num surto de “Border Disease”. Sinais clínicos como alterações de pêlo, alterações de conformação também não estão presentes num quadro de meningoencefalite. É uma patologia rara que corresponde a

4% das alterações neurológicas em ovinos (Guedes *et al.*, 2007). O diagnóstico deve ser complementado laboratorialmente através da recolha de líquido cefalorraquidiano. Deve suspeitar-se desta afecção em casos de não ingestão de colostro ou em casos em que as maternidades estejam pouco higienizadas. O tratamento consiste na administração de grandes doses de antibiótico para ter efeito a nível cerebral, mas na maior parte dos casos não tem sucesso (Kahn, 2005).

2.1.5.3. Poliencefalomalácia

É uma afecção neurológica, não infecciosa que afecta ruminantes de todas as idades, derivada normalmente de uma deficiência em tiamina. Esta deficiência tem como causas possíveis: alterações no metabolismo da tiamina, associadas a dietas altas em concentrados, levando a acidose clínica ou subclínica, que reduz o número de microrganismos do rumem que sintetizam tiamina e que permite o crescimento das bactérias que produzem tiaminase; ingestão de análogos da tiamina, como o amprólio; ingestão de pastagem contendo tiaminases; intoxicação por enxofre; privação de água e/ou intoxicação por cloreto de sódio; e intoxicação por chumbo (Carlton & McGavin 1990; Smith & Sherman 1994, Radostits *et al.*, 2000; Lemos & Nakazato 2001). Tem como sinais clínicos mais constantes, cegueira, decúbito, ataxia e depressão. Outros sinais menos frequentes são “head pressing”, “circling”, anorexia, atonia ruminal, incoordenação, paralisia, ranger de dentes, diminuição da sensibilidade dos reflexos palpebral e pupilar, estrabismo lateral, nistagmos, pupilas dilatadas e salivação. O facto de não estarem descritos casos de aborto, alterações a nível de pêlo e alterações de conformação pode diferenciar esta patologia de “Border Disease”. Também o facto de esta afecção surgir em qualquer idade enquanto a “Border Disease”, com sintomatologia semelhante à poliencefalomalácia, surgir apenas em neonatos pode permitir uma diferenciação. O tratamento consiste em suplementar os animais de tiamina e eliminar o factor que está a provocar esta carência (Lima *et al.*, 2005).

2.1.5.4. “Daft lamb Disease”

Afecção pouco estudada e rara dos pequenos ruminantes com origem genética que ocorre em neonatos. Também conhecida como atrofia cerebelar cortical hereditária tem como sinais clínicos ataxia, incapacidade de andar e depressão. O diagnóstico é feito *post mortem* através de exames histológicos onde se verifica células de Purkinje do cerebello vacuolizadas, necróticas ou apenas vestígios destas. Observa-se também diminuição no tamanho das células musculares tipo I e II bem como aumento das células intrafasciculares. Outra alteração

presente é a interrupção nos axónios terminais dos nervos intramusculares. Estudos demonstraram que esta patologia tem etiologia genética nomeadamente num gene recessivo. Para confirmar o diagnóstico, é importante enviar amostras para laboratório para excluir possíveis infecções de “Border Disease” e excluir carências em cobre ou selénio (Bradley, 1978).

2.1.5.5. “Akabane Disease”

Afecção causada pelo Akabane vírus, nome originado pelo distrito Japonês onde foi isolado pela primeira vez, afecta ruminantes e pertence à família *Bunyaviridae* do género *Orthobunyavirus*. Está distribuído em regiões tropicais e temperadas, especialmente em África. É um vírus de transmissão vectorial através do *Culicoides* midges, dos mosquitos *Aedes* spp. e *Culex* spp. e através de algumas espécies de carraças. Afecta apenas neonatos não estando descrito nenhuma sintomatologia em adultos. Em fêmeas gestantes infectadas o vírus passa pela placenta e infecta o feto, sobretudo o seu sistema nervoso central. A sintomatologia verificada em neonatos é artrogripose, hidranencefalia, poliencfalomielite e alterações mandibulares (braquignatismo e prognatismo). Outros sintomas verificados foram fenda palatina, lordose e cifose. Em afecções severas podem ocorrer abortos. Como consequência da sintomatologia os animais infectados apresentam alterações neurológicas como ataxia, hipermetria, nistagmus, opistótonos, entre outros. Pode obter-se um diagnóstico definitivo através de isolamento viral e PCR. Testes serológicos como ELISA têm pouca relevância clínica uma vez que os anticorpos permanecem até dois anos em circulação e não indicam infecção aguda (The Animal Health & Production Compendium [AHPC], 2011).

2.1.5.6. Schmallerberg Vírus

Um novo vírus pertencente à família, género e serogrupo do Akabane vírus foi reportado em Novembro de 2011 na Alemanha e Holanda. Recebeu o nome da região alemã em que foi detectado o primeiro surto deste vírus na Europa: Schmallerberg (Van den Brom, 2012). Até hoje foi notificado à European Food Safety Authority a presença do Schmallerberg vírus em ruminantes da Alemanha, Holanda, Bélgica, França, Itália, Luxemburgo, Espanha e Reino Unido. O vírus causa a seguinte sintomatologia transitória em adultos: febre, diarreia e diminuição na produção de leite. Porém, em fêmeas gestantes, pode causar abortos, e, em neonatos, malformações congénitas tal como o Akabane vírus. Está provado que tem transmissão vectorial (European Centre for Disease Prevention and Control, 2012).

2.1.5.7. Brucelose

Doença infecciosa provocada por bactérias do género *Brucella* que infecta primariamente bovinos, caprinos, suínos, cães e ovinos e secundariamente outros animais como o homem e equinos. Está presente em todo o mundo. No caso dos pequenos ruminantes o agente responsável é a *Brucella ovis* sendo os sinais clínicos nos machos, febre, taquipneia, depressão, orquite e epididimite. Nas fêmeas os sinais clínicos mais evidentes são abortos no último terço de gestação e aumento no número de cios, enquanto os neonatos nascem pequenos e débeis levando por vezes à morte perinatal (Radostits *et al.*, 2007). O facto de os borregos não apresentarem alterações de conformação e/ou comportamentais e os machos serem mais susceptíveis com sinais clínicos mais evidentes, pode diferenciar esta afecção de “Border Disease”. No entanto deve recorrer-se à confirmação do diagnóstico através de meios de diagnóstico nomeadamente o isolamento do agente ou através de testes serológicos (Radostits *et al.*, 2007).

2.1.5.8. Febre Q

A febre Q é uma afecção causada pela proteobactéria *Coxiella burnetii* que afecta praticamente todos os mamíferos. Uma infecção em pequenos ruminantes tende a ser assintomática, a não ser que a infecção ocorra em fêmeas gestantes, e por transmissão vertical infecte o feto. Nesses casos pode ocorrer aborto no final da gestação, partos prematuros, nascimento de animais fracos ou nados mortos (Arricau-Bouvery & Rodolakis, 2004). A serologia é o mais utilizado na confirmação de diagnóstico. Existe um vasto leque de testes sendo os mais vulgarmente utilizados a imunofluorescência indirecto, ELISA e fixação do complemento (Davis *et al.*, 2004). No caso de infecções de febre Q em pequenos ruminantes não estão descritos casos de neonatos com alterações quer de conformação, quer de pelagem ou de comportamento, o que pode ajudar a diferenciar estas duas patologias.

2.1.5.9. Toxoplasmose

Tem como etiologia o *Toxoplasma gondii* um protozoário que infecta mamíferos, aves e o homem tendo como hospedeiro definitivo o gato. É prevalente em muitas áreas do mundo, tendo importância veterinária e médica por ser causa de aborto e doenças congénitas em humanos (Tenter *et al.*, 2000). Os pequenos ruminantes podem apresentar episódios febris, anorexia e perda de peso durante a fase aguda da doença (cerca de 10 a 15 dias após a infecção). Classicamente a afecção causa aborto, falhas reprodutivas, maceração fetal e nados mortos. O aborto ocorre preferencialmente naqueles animais que adquiriram a infecção pela

primeira vez durante a gestação, cerca de 5 a 10 dias após a fase de parasitemia (Radostits *et al.*, 2007). Como diagnóstico devem efectuar-se exames serológicos como imunofluorescência ou testes de aglutinação (SILVA *et al.*, 2002). Também é possível diferenciar a toxoplasmose de “Border Disease” através da ausência de alterações morfológicas e comportamentais em neonatos infectados com *Toxoplasma gondii*.

2.1.5.10. Leptospirose

O agente etiológico pertence ao género *Leptospira* que são bactérias espiraladas, longas, finas, pontiagudas e activamente móveis. Infecta animais domésticos e silvestres e o homem como final da cadeia epidemiológica. Os animais silvestres, mamíferos (roedores, herbívoros, insectívoros, carnívoros), aves, répteis e anfíbios são portadores ou reservatórios de leptospiros para o homem e espécies domésticas. Comparando com outras espécies domésticas, os pequenos ruminantes são menos susceptíveis à leptospirose. A maioria das infecções são sub-clínicas. Formas clínicas da doença são observadas em dois grupos de animais: animais jovens podem apresentar uma sintomatologia aguda grave caracterizada por icterícia, hematuria, hemoglobinúria, nefrite, meningite e, em alguns casos, morte; fêmeas lactantes ou prenhas podem apresentar agaláxia e aborto no terço final da gestação (Ellis, 1994). Apesar do aborto ser o único sinal clínico comum com “Border Disease”, deve realizar-se o diagnóstico laboratorial da leptospirose, sendo o teste de aglutinação microscópica com antígenos vivos o mais utilizado por pesquisadores de todo o mundo para diagnóstico da leptospirose (Adler & De La Peña, 2010).

2.1.5.11. Aborto Enzoótico Ovino

A nova espécie *Chlamydophila abortus*, anteriormente classificada como *Chlamydia psittaci*, é a bactéria intracelular que causa o aborto enzoótico ovino. Aitken *et al.*, (1990) e Leonard *et al.*, (1993) consideraram a *Chlamydophila abortus* a maior causa de abortos em ovelhas na Europa. Além do aborto, outros sinais de distúrbios reprodutivos como, nascimentos prematuros ou nascimentos de animais fracos e nados mortos, também são associados à infecção por *Chlamydophila abortus*. Neonatos podem apresentar quadros respiratórios inespecíficos e de encefalites, que geralmente morrem 48 horas após o nascimento, mesmo recebendo tratamento de suporte (Longbottom & Coultler, 2003). Para diferenciar este quadro clínico de “Border Disease” é essencial recorrer ao diagnóstico laboratorial uma vez que além do aborto estão descritos casos de encefalites em neonatos. Culturas celulares para pesquisa de *Chlamydophila abortus* ou pesquisa de material genético

através de RT-PCR, têm sido utilizados no diagnóstico de aborto enzoótico ovino. Os testes de detecção de anticorpos como ELISA indirecto e fixação de complemento, têm sido amplamente utilizados de forma a rastrear efectivos de grandes dimensões (World Organisation for Animal Health [OIE], 2004).

2.1.5.12. Listeriose

Listeriose é uma doença causada pela bactéria *Listeria monocytogenes* que infecta diversas espécies animais, inclusive o homem, porém os ruminantes parecem ser mais susceptíveis. Dois quadros distintos são típicos da infecção pela bactéria *Listeria monocytogenes*: um com características neurológicas (meningoencefalite) e outro em que ocorre aborto, metrite, retenção da placenta, e presença de abscessos no fígado, baço e em outras vísceras. Os sintomas que podem estar presentes num quadro neurológico são: perda de equilíbrio, salivação abundante, conjuntivite, incoordenação motora e “circling”. Pode haver evolução do quadro para uma paralisia, decúbito lateral permanente, desvio lateral da cabeça e opistótono. A doença na forma nervosa é observada esporadicamente em ovinos. O diagnóstico de eleição para a listeriose é o PCR para detecção de material genético (Nassar, 2008). A realização de exames laboratoriais para o diagnóstico definitivo de listeriose é importante pois esta apresenta uma sintomatologia semelhante à “Border Disease”.

2.1.6. Achados Laboratoriais

As alterações registadas em hemogramas e painéis bioquímicos resultantes de análises de sangue proveniente de animais infectados com BDV não são consistentes. A única alteração que parece estar associada a uma infecção de Border Disease é linfocitopenia (Radostits *et al.*, 2007). Porém, um estudo realizado na Turquia demonstrou que ovelhas infectadas naturalmente por BDV apresentavam um aumento nos valores de colesterol, glucose, AST, LDH e HDL. No mesmo estudo animais PI apresentaram uma diminuição significativa nos valores das proteínas totais, amilase e HDL, enquanto revelaram aumento nos valores de ALP, creatina kinase e glucose. Os autores concluíram que as alterações quer em animais infectados naturalmente quer em animais PI podem derivar de infecções secundárias e não infecção de BDV (Serkal *et al.*, 2010). Noutro estudo realizado em 2009 concluíram que a única alteração provocada pelo BDV era a linfocitopenia e as restantes alterações resultavam do estado caquético dos animais e das infecções secundárias causadas pela baixa imunidade (Fernandez-Sirera *et al.*, 2009). Já García-Pérez *et al.*, (2008) revelam

que os níveis de leucócitos de 11 dos 15 borregos PI analisados no seu estudo são bastantes baixos em comparação com os valores normais.

De uma forma geral a leucopénia, principalmente a linfocitopénia, é a única alteração que é consistente em hemogramas e painéis bioquímicos realizados a borregos PI's com BDV.

2.1.7. Achados de Necrópsia

Na necrópsia os animais infectados com Border Disease congénita podem não apresentar alterações significativas. Porém, é comum apresentarem o pêlo anormal e redução do volume cerebral e da medula espinal (Radostits *et al.*, 2007). As alterações macroscópicas mais comuns numa necrópsia são: hidranencefalia, encefalomalácia, microencefalia, hipoplasia cerebelar, anomalias na caixa torácica, braquignatia, anomalias nos ossos craniais, redução do espaço interorbital, diminuição do espaço orbital, diminuição do comprimento crânio-caudal corporal, alterações nos ossos longos e nas articulações e aumento do número de fibras secundárias do pêlo e da sua pigmentação (Smith, 2009). Histologicamente verifica-se uma deficiência de mielina com desmielinização e mielogénese anormal, bem como uma periarterite nodular imunomediada (Smith, 2009; Radostits *et al.*, 2007).

A placenta de fêmeas infectadas durante a gestação é comum apresentar inflamação endotelial generalizada com oclusão venal derivada de trombos, fibrose e necrose celular (Smith, 2009).

Necrópsias realizadas em animais que manifestaram Border Disease de forma aguda ou em animais PI em que o vírus se tornou citopático, geralmente apresentam inflamações multifocais crónicas sistémicas como nefrites, miocardites e pneumonias. Normalmente o intestino é o órgão mais afectado onde ocorre uma enteropatia ulcerativa hiperplásica, em que são visíveis microscopicamente úlceras hiperplásicas na mucosa intestinal com necrose e infiltrados de células mononucleares (Nettleton *et al.*, 2007).

2.1.8. Meios de Diagnóstico

Apesar de a Border Disease ter sinais clínicos típicos, muitas das vezes não é possível estabelecer o diagnóstico desta afecção baseado apenas nos sinais clínicos. Este facto deriva das consequências de uma infecção de BD depender de inúmeros factores como, a idade do feto, a estirpe e a carga viral, a raça do animal e a capacidade de resposta imunitária do feto (García-Pérez *et al.*, 2009). Deste modo uma infecção poderá causar borregos “Hairy Shakers” que são típicos desta afecção, sendo fácil de diagnosticar, ou poderá causar, por

exemplo, apenas infertilidade no rebanho o que não é patognomónico de Border Disease (Nettleton *et al.*, 2009). Nestes casos em que os sinais clínicos não são evidentes é importante recorrer a técnicas laboratoriais de diagnóstico para confirmar o diagnóstico. As técnicas laboratoriais de diagnóstico directo mais comuns para diagnosticar pestivírus são o isolamento viral, imunohistoquímica, reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), e ELISA directo, enquanto as técnicas laboratoriais de diagnóstico indirecto mais comuns são, neutralização viral, ELISA indirecto, imunodifusão em agar gel e fixação do complemento (World Organisation for Animal Health [OIE], 2004; Kirkland & MacKintosh, 2006). Nas técnicas laboratoriais de diagnóstico indirecto, também conhecidas como testes serológicos, devem ser sempre utilizados soros de controlo positivos e negativos em cada teste. O soro de qualquer animal (virémico, PI ou saudável) pode ser utilizado para determinar a prevalência de BDV num rebanho, região ou país testando normalmente 10% do efectivo. Por outro lado para realizar um diagnóstico duma infecção aguda de BDV é necessário utilizar soros de animais convalescentes (World Organisation for Animal Health [OIE], 2004). Os testes serológicos são úteis para detectar neonatos expostos ao vírus após os 80 dias de gestação, porém pode ser um resultado inconclusivo caso já tenha havido ingestão de colostro. Qualquer que seja a quantidade de anticorpos presentes num neonato sujeito ao diagnóstico antes de ingestão de colostro indica exposição ao vírus no útero. Por outro lado, um resultado negativo num borrego que ainda não ingeriu colostro não é indicativo de que não houve exposição ao vírus, uma vez que animais PI tendem a ser imunotolerantes ao vírus e consequentemente nascem sem anticorpos contra BDV (Pugh, 2008).

2.1.8.1. Isolamento Viral

Para um diagnóstico definitivo de BDV é necessário um isolamento viral a partir de culturas celulares (García-Pérez *et al.*, 2009). Culturas de células, ovos e animais de laboratório podem ser utilizados para isolamento do vírus, embora a maioria dos laboratórios utilize culturas de células (Wong, 2003). O isolamento poderá ser realizado a partir de culturas realizadas em células primárias ou secundárias de ovino. As estirpes podem ser caracterizadas como biótipos CP ou NCP, pela presença ou ausência de efeitos citopatogénicos característicos evidentes em culturas celulares inoculadas há 48 horas. As estirpes NCP são identificadas em culturas celulares através de imunoenzimas ou imunofluorescência (World Organisation for Animal Health [OIE], 2004). Os tecidos mais utilizados para recolha de amostras de BDV são: tiróide, cérebro, baço, intestino, linfonodos (Nettleton *et al.* 2008), rim, testículo, pulmão, músculo do feto, plexo coróide (World

Organisation for Animal Health [OIE], 2004) e sangue não coagulado ou soro (Kirkland & MacKintosh, 2006). O sangue é mais indicado do que o soro em casos que os títulos de anticorpos adquiridos com a ingestão do colostro sejam altos. A utilização de soro é desaconselhada para diagnosticar BDV em neonatos ou em animais muito jovens que ainda não ingeriram colostro (Pugh, 2008). Apesar do isolamento viral ser uma técnica de diagnóstico laboratorial muito sensível e específico é também bastante caro e lento, e tem que ser realizado em laboratórios de referência (García-Pérez *et al.*, 2009; World Organisation for Animal Health [OIE], 2004). A sensibilidade do isolamento viral diminui se durante alguma fase do procedimento laboratorial houver contaminação accidental por outro vírus ou por anticorpos uma vez que poderá dar origem a falsos positivos ou falsos negativos (Kirkland & MacKintosh, 2006). A especificidade diminui se os tecidos de origem da recolha da amostra estiverem autolisados (García-Pérez *et al.*, 2009).

2.1.8.2. Imunohistoquímica

Testes de imunohistoquímica podem ser realizados para diagnosticar Border Disease (Loken, 2000). A técnica é utilizada para detectar antígenos em células de um determinado tecido previamente fixado em parafina ou em formol ou em secções de tecido congelado através de crióstato (World Organisation for Animal Health [OIE], 2004). Os tecidos com maiores cargas antigénicas, logo os melhores para serem utilizados neste tipo de técnicas, são cérebro, glândula tiróide, pele e placenta (Thür *et al.*, 1997). Os anticorpos a utilizar devem ser anticorpos monoclonais de pestivírus específicos para BDV (Kirkland & MacKintosh, 2006). Os complexos antígeno-anticorpo são corados e posteriormente são visualizados recorrendo a um microscópio de fluorescência no caso de se realizar a técnica de imunofluorescência. No caso de se utilizar a técnica imunoperoxidase o anticorpo é conjugado com a enzima peroxidase, que catalisa uma reacção que produzirá coloração. São testes muito sensíveis e rápidos, ideais para a pesquisa de BDV em fetos. No caso dos tecidos estarem autolisados é preferível fixar os tecidos em parafina ou em formol em vez de utilizar secções do crióstato (Thür *et al.*, 1997). Estes testes são realizados apenas em alguns laboratórios de referência e apresentam custos elevados (Wong, 2003).

2.1.8.3. Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Outro meio de diagnóstico directo utilizado é o RT-PCR que identifica se em amostras de sangue, soro, células do buffy coat, tecidos frescos ou fixados em formol, está presente material genético do vírus (Nettleton *et al.*, 2009). A partir de uma pequena amostra

de RNA é sintetizado uma sequência de ADN através de uma amplificação do material genético a partir de reacções em cadeia (Wong, 2003). É um teste relativamente rápido (em comparação com as restantes técnicas de diagnóstico directo) e muito sensível e tem a vantagem de detectar material genético do vírus se este estiver danificado ou se já não estiver infeccioso, como é o caso da pesquisa de material genético em amostras provenientes de fetos infectados (Kirkland & MacKintosh, 2006). Tem como contrapartida o facto de ocorrerem falsos positivos, uma vez que identifica resíduos de material genético em amostras nas quais o vírus se encontra inactivo, ou devido à contaminação de amostras durante a colheita ou até mesmo à contaminação no laboratório (Goyal, 2005; Kirkland & MacKintosh, 2006). É uma técnica dispendiosa o que leva a que seja utilizada em poucas situações. Em efectivos de grandes dimensões a utilização de RT-PCR não é prático e torna-se economicamente inviável (Kirkland & MacKintosh, 2006). Uma solução para este tipo de casos é analisar *pools* sanguíneos ou tanques de leite, em que o teste é realizado a um determinado número de animais e não apenas a um animal (Goyal, 2005)

2.1.8.4. ELISA Directo

A utilização da técnica ELISA directo revolucionou o diagnóstico laboratorial para muitas patologias inclusive para a “Border Disease”. Esta técnica é bastante menos dispendiosa que o isolamento viral e que o RT-PCR, e os resultados são obtidos em 1 a 2 dias ao invés de 1 a 2 semanas. Estas vantagens permitem que esta técnica possa ser utilizada em efectivos de grandes dimensões (Kirkland & MacKintosh, 2006). O ELISA directo detecta os antígenos virais circulantes no hospedeiro. São utilizados anticorpos específicos para “Border Disease” juntamente com a amostra em que se quer diagnosticar o vírus, de forma a obter um complexo antígeno-anticorpo. Após a formação deste complexo é adicionado uma enzima de forma a identificar se o antígeno corresponde com os anticorpos contra Border Disease (World Organisation for Animal Health [OIE], 2004). A amostra ideal para a realização desta técnica é leucócitos de sangue periférico, mas qualquer amostra de sangue ou amostras de tecidos, especialmente de baço, são também válidas (Kirkland & MacKintosh, 2006). A sensibilidade deste teste é semelhante à sensibilidade do isolamento viral e depende da quantidade de antígeno presente na amostra (García-Pérez *et al.*, 2009). Apesar do ELISA directo ser de elevada sensibilidade para diagnosticar animais PI, é menos sensível a detectar antígenos em infecções agudas (Kirkland & MacKintosh, 2006). Tal como o isolamento viral elevadas quantidades de anticorpos colostrais nas amostras utilizadas podem levar a um falso negativo em animais PI (World Organisation for Animal Health [OIE], 2004). É uma técnica

que permite um diagnóstico rápido, prático e barato tornando-se assim no diagnóstico de eleição para a detecção e identificação dos animais PI que não tenham anticorpos maternos (García-Pérez *et al.*, 2009; World Organisation for Animal Health [OIE], 2004)

2.1.8.5. Neutralização Viral

No teste de neutralização viral originalmente utilizava-se uma estirpe citopática de BDV para misturar com o soro obtido da amostra (Nettleton *et al.*, 2008), porém a estirpe utilizada podia ser bastante distante da estirpe local que se pretendia diagnosticar (Kirkland & MacKintosh, 2006). As estirpes não citopáticas são mais abrangentes na população sendo por isso recomendadas na realização desta técnica. A técnica consiste em misturar com o soro obtido da amostra a estirpe que se quer diagnosticar. Após um período de incubamento da mistura são utilizadas culturas celulares ou animais de teste, de forma a verificar se o soro possui anticorpos neutralizantes contra a estirpe utilizada. O teste de neutralização é lento e trabalhoso de forma que não é utilizado rotineiramente (Nettleton *et al.*, 2008). Uma desvantagem do teste consiste na dificuldade em escolher a estirpe. Existem inúmeras estirpes de BDV mas a estirpe local é a ideal para a realização do teste (World Organisation for Animal Health [OIE], 2004). No caso de utilização da estirpe correcta o teste é bastante específico (Kirkland & MacKintosh, 2006).

2.1.8.6. ELISA Indirecto

Outro teste utilizado para pesquisa de anticorpos contra BDV é o teste de ELISA indirecto (Nettleton *et al.*, 2007). É normalmente utilizado para averiguar os níveis de anticorpos para uma determinada afecção num grande grupo de animais (Kirkland & MacKintosh, 2006). Neste teste é utilizado o antígeno específico que se pretende diagnosticar aderido a um suporte sólido (placa de ELISA). De seguida, colocam-se sobre a placa os soros da amostra em teste. Se houver anticorpos no soro específico para o antígeno em teste forma-se um complexo antígeno-anticorpo. Depois adiciona-se à mistura um anticorpo secundário anti-anticorpo primário ligado a uma enzima e em seguida adiciona-se o seu substrato. A enzima ao ligar-se ao seu substrato forma uma coloração. Quanto maior a coloração maior a positividade do teste (Nettleton *et al.*, 2008). É uma técnica rápida e económica em comparação à técnica de neutralização viral. A especificidade e sensibilidade tem vindo a aumentar uma vez que tem havido melhorias no uso de anticorpos monoclonais bem como a utilização de antígenos bem definidos derivados de técnicas de DNA recombinante (Goyal,

2005). São comercializados Kits de diagnóstico que utilizam a técnica de ELISA indirecto que afirmam ter uma sensibilidade e uma especificidade de 94%.

2.1.8.7. Imunodifusão em Agar Gel

O teste de imunodifusão em agar gel também poderá ser uma alternativa para pesquisa de anticorpos (Pugh, 2008). Este teste é realizado num gel que contem poços nas extremidades. Adiciona-se numa das extremidades o antígeno em questão e na outra extremidade o soro que se quer testar. O soro é transportado por difusão. Caso a amostra seja positiva observa-se na placa de agar gel um precipitado que corresponde à formação dum complexo antígeno-anticorpo (Ferreira *et al.*, 1996). É uma técnica menos sensível que a neutralização viral e que o ELISA indirecto (World Organisation for Animal Health [OIE], 2004), mas apresenta a vantagem de saber se os resultados obtidos são de uma infecção recente. É um teste mais utilizado para investigação uma vez que permite identificar qual a espécie de pestivírus presente na amostra (Kirkland & MacKintosh, 2006).

2.1.9. Tratamento

Não existe nenhum tratamento eficaz contra o BDV (Scott, 2007; Radostits *et al.*, 2007; Kahn, 2005; Pugh, 2008). Tratamento sintomático e de infecções secundárias, manter os animais de pé e providenciar boas camas em terreno sólido são os cuidados de suporte que se podem prestar aos animais infectados (Pugh, 2008). O tratamento de suporte permite que os animais afectados sobrevivam ao período neonatal, porém, apresentam um crescimento bastante mais lento em relação a borregos saudáveis e são mais susceptíveis a afecções secundárias. Deste modo não é economicamente viável tentar recuperar animais afectados (Radostits *et al.*, 2007). Alguns autores, como o prognóstico é tão reservado, consideram que a melhor opção é eutanasiar borregos PI's por razões de bem-estar animal (Scott, 2007).

2.1.10. Controlo Sanitário

O controlo de “Border Disease” depende do nível de infecção de cada rebanho (Nettleton *et al.*, 2004):

- Em rebanhos livres de BDV as ovelhas e os carneiros de substituição, caso sejam adquiridos de outra exploração, devem ser submetidos a exames laboratoriais de forma a verificar se estão infectados e mantidos em quarentena (Radostits *et al.*, 2007). Deve realizar-se uma técnica de diagnóstico directo uma vez que os testes serológicos indicam apenas contacto prévio com o vírus (World Organisation for

Animal Health [OIE], 2004). No caso de aquisição de um grande número de animais devem realizar-se “pools” sanguíneos e realizar um RT-PCR de forma a diminuir os custos laboratoriais. Todas as fêmeas de substituição devem ser mantidas separadas do rebanho até à data do primeiro parto (Radostits *et al.*, 2007; Nettleton *et al.*, 2004). Idealmente todas as fêmeas de substituição devem ser borregas da própria exploração e apenas os carneiros devem ser adquiridos fora da exploração. Estes devem ser submetidos também a exames laboratoriais de diagnóstico directo de forma a não introduzir o vírus na exploração. O risco de infecção de ovelhas a partir de bovinos é elevado tornando essencial manter o rebanho sem contacto com bovinos (Nettleton *et al.*, 2007).

- Surtos esporádicos de BDV podem ser controlados com base no refugo de todos os borregos da época de parto e as ovelhas suspeitas de terem introduzido o vírus na exploração (Nettleton *et al.*, 2004).
- Em rebanhos infectados o controlo passa por imunizar o rebanho e evitar que as ovelhas fiquem susceptíveis a infecções nos primeiros 85 dias de gestação. Identificar e eliminar os animais PI que excretam o vírus constantemente é outra medida necessária, uma vez que estes animais perpetuam a doença na exploração (Pugh, 2008). Porém, a identificação destes animais pode ser difícil pois os borregos PI podem nascer sem sintomatologia da doença. Borregos que nasçam PI permanecem PI mesmo que os sintomas típicos como tremores e pêlo comprido desapareçam por volta dos 1-2 meses de idade. Este facto torna impossível diferenciar, sem recorrer a exames laboratoriais, animais PI dos restantes, uma vez que já não apresentam sintomas de BD. Para realizar o diagnóstico em neonatos deve recolher-se uma amostra sanguínea pré-colostral. Como animais PI são seronegativos deve realizar-se o isolamento viral preferencialmente a partir de leucócitos do “buffy coat” do sangue ou um RT-PCR a partir de amostras recolhidas em biopsias de pele (Berriatua *et al.*, 2004). Animais jovens ou adultos infectados *post natal* podem ser identificados através dum rastreio serológico seguido de isolamento do vírus nos animais seronegativos de forma a reduzir custos laboratoriais. Este rastreio, realizado normalmente nos animais de substituição, deve ser feito após os 6 meses de idade, altura em que já não possuem anticorpos maternos. Como alternativa não se deve utilizar nenhum borrego do próprio rebanho como reprodutor de substituição (Radostits *et al.*, 2007). Uma forma de imunizar

novas fêmeas de reprodução susceptíveis a contrair BD consiste em juntá-las com borregos PI antes de ficarem gestantes. O ideal neste processo de imunização é confinar as fêmeas e os PI num parque pequeno e fechado durante pelo menos 3 semanas. Este período de exposição tem de terminar no máximo 2 meses antes da época de cobrição (Nettleton *et al.*, 2007). Este procedimento funciona como uma “vacinação natural”, sendo que o efeito de seroconversão desejado é menor nas fêmeas de substituição do que em fêmeas adultas (Radostits *et al.*, 2007). É um procedimento que não é 100% seguro e pode haver transmissão de outros agentes infecciosos, incluindo outros agentes abortivos. É necessário ter a certeza que os abortos verificados na exploração têm origem no BDV (Scott, 2007). Berriatua *et al.*, (2004) afirma que apesar da presença de animais PI aumentar a seroconversão do rebanho o grau de imunização esperada nas fêmeas não é o suficientemente rápido para prevenir a doença adequadamente.

2.1.11. Vacinação

A implementação de um programa vacinal de forma a prevenir infecções de BDV não é consensual (Pugh, 2008). Foram desenvolvidas vacinas inactivadas e vivas atenuadas com resultados inconclusivos no que diz respeito à imunização fetal contra BDV (Vantsis *et al.*, 1980). Estes autores concluíram que o feto continuava em risco de infecção apesar de a fêmea gestante estar imunizada e que as estirpes utilizadas nas vacinas eram antigenicamente diferentes das estirpes no terreno não conferindo portanto uma imunização adequada. Existiu apenas uma vacina comercial com bons resultados. Era uma vacina inactivada que continha as estirpes mais representativas de BDV e a estirpe BVDV-1, porém, não há evidência de que esta ainda esteja disponível no mercado (Brun *et al.*, 1993). Por outro lado, a OIE refere que já foram preparadas vacinas vivas inactivadas na Europa, para fins experimentais e comerciais (World Organisation for Animal Health [OIE], 2004). A vacina ideal para obter imunização deveria conter os antigénios de BDV e de BVDV-1, e deveria ser aplicada num programa de vacinação que consistiria em vacinar todos os animais jovens que irão entrar no efectivo para reprodução, de forma a maximizar a imunidade no início da gestação evitando infecções transplacentárias protegendo assim os fetos (Nettleton & Entrican, 1995; Nettleton & Willoughby, 2008). Num estudo efectuado em 1993 foram infectadas com BDV 15 ovelhas entre o 54º e o 65º dia de gestação, em que 7 ovelhas foram vacinadas com uma vacina morta e 8 ovelhas não foram vacinadas como controlo. Dos resultados obtidos concluiu-se que as 7

ovelhas vacinadas tiveram borregos saudáveis, enquanto 5 ovelhas das 8 do controlo geraram animais com sintomatologia de BDV (Brun *et al.*, 1993). Porém, é necessário realizar mais estudos e desenvolver futuras vacinas que sejam testadas em ovelhas gestantes (Nettleton *et al.*, 2008). Vacinas inactivadas ou mortas contra BVDV podem ser úteis para ovelhas em risco. Contudo estas vacinas provaram ser mais efectivas em prevenir a sintomatologia aguda da doença do que prevenir infecções no útero. Deste modo, estas vacinas diminuem a virémia e infecções fetais, mas não as elimina na totalidade (Pugh, 2008). Por outro lado, Kahn (2005) sugere que não é recomendado utilizar vacinas contra a diarreia viral bovina em ovelhas, uma vez que frequentemente os isolados de BDV são antigenicamente distintos dos vírus mais comuns de diarreia viral bovina. Contudo a maioria dos autores afirma que utilizar vacinas mortas de várias estirpes BVDV pode conferir uma protecção parcial contra infecções congénitas nos pequenos ruminantes (Carlsson *et al.*, 1991, Bruschke *et al.*, 1996; Bruschke *et al.*, 1999). O uso de vacinas vivas de BVDV atenuadas deve ser evitado, uma vez que não existem dados suficientes que garantam a segurança dos animais. Menzies (2012) é de opinião que as estratégias de controlo deveriam passar pelo desenvolvimento e comercialização de vacinas seguras e eficazes em vez de testarem e removerem os animais PI e de adquirir animais de substituição, principalmente em explorações de grandes dimensões em que o recurso a repetidos testes de diagnóstico tem custos insuportáveis para os produtores.

2.1.12. “Border Disease” em Caprinos

Testes serológicos realizados em muitos países de todos os continentes indicam que as infecções naturais de pestivírus em cabras ocorrem em todo o mundo. Porém, são poucos os casos de isolamento viral de infecções naturais em cabras, apesar de estas serem susceptíveis a BVDV, CSFV e BDV após infecção experimental (Løken, 2000). As infecções naturais em cabras ocorrem sobretudo por via oro-nasal assim como nas ovelhas (Gardiner & Barlow, 1972). Infecções experimentais em cabras no primeiro terço da gestação revelam que o vírus atravessa a placenta e infecta o feto. Porém a taxa de sobrevivência do feto nesta fase de gestação foi bastante baixa (Depner *et al.*, 1991). Deste modo, em infecções naturais o número de cabritos PI é bastante baixo levando à conclusão que as ovelhas, e principalmente os bovinos, são os reservatórios de pestivírus que infectam os caprinos (Løken, 2000).

A sintomatologia verificada numa infecção natural de BD em caprinos consiste essencialmente em problemas reprodutivos e cabritos fracos à nascença. Está descrito apenas um caso de manifestação clínica consistente com BD espontânea que ocorreu na Noruega e onde um cabrito infectado *in útero* apresentou alterações neurológicas. O cabrito apresentava

severos tremores no corpo todo e tinha bastante dificuldade em manter-se de pé e em deslocar-se. O seu tamanho porém era normal, apresentava reflexo de sucção e não possuía qualquer alteração no pêlo. Na necrópsia não foi verificado grandes alterações e histologicamente as lesões estavam confinadas ao cérebro e medula espinal, apresentando alterações nas bainhas de mielina, aumento no número de células de Glia e vasculite (Løken *et al.*, 1982). Experimentalmente já foram descritos vários casos de manifestação clínica consistente com BD congénita em cabritos. Para realizar o diagnóstico laboratorial são aplicadas as mesmas técnicas que são utilizadas para pesquisa de BDV em ovinos. O controlo, devido à quase inexistência de cabritos PI, baseia-se em evitar o contacto com outras espécies como os ovinos e bovinos que são os grandes reservatórios de pestivírus de forma a evitar a infecção de cabras gestantes (Løken, 2000).

2.1.13. Importância Económica

Os efeitos de uma infecção de BDV dependem do estado imune do rebanho e se esta ocorre durante uma gestação (Radostits *et al.*, 2007). O verdadeiro impacto económico num rebanho susceptível a BDV é verificado no aumento de fêmeas vazias, de abortos, de borregos “Hairy Shaker” e no aumento de mortes neonatais (Scott, 2007). Dependendo da estirpe de BDV estas perdas podem ser entre 25% a 75% dos borregos esperados (Nettleton *et al.*, 1992). Porém, as perdas derivadas do BDV podem muitas vezes passar despercebidas em rebanhos de baixas produtividades e elevadas perdas, como acontece muitas vezes em rebanhos de raças cruzadas e com pouco acompanhamento do médico veterinário (Scott, 2007). Numa avaliação geral as perdas económicas derivadas da infertilidade, abortos, mortes neonatais e carcaças de baixo rendimento, podem originar uma redução do lucro da exploração em mais de 20% (Sharp & Rawson, 1986).

Realizando um exercício prático, considera-se um rebanho de 500 ovelhas, que tem aplicado um sistema de produção tradicional de Portugal:

1. Considerando que o rebanho apresenta um índice de fertilidade de 80% produz um total de 400 borregos.
2. O borrego é vendido com 25Kg a um preço de 65€ (26000 €)
3. São atribuídos subsídios para a produção de ovinos bem como ajudas económicas a explorações com medidas agro-ambientais e um valor de 8 € por borrego abatido e comercializado através de organizações de produtores reconhecidas, dando o somatório num total de 40200 €.

4. A exploração apresenta um proveito total de 66200 €

Os custos fixos de uma exploração consistem em salários, seguros, renda de herdade de 150 Hectares, melhoramento de pastagens, manutenção de infra-estruturas, sanidade animal (sanidade anual e intervenções veterinárias), complemento alimentar e renovação do efectivo (20% por ano). Consideramos um total de 47500 € com os custos fixos.

Como lucro total teórico de uma exploração de 500 ovinos em Portugal gerida através de um sistema tradicional de produção, teremos cerca de **18700 €**.

Consideremos agora que o rebanho fica infectado com um surto de BDV:

1. De uma estirpe que causa uma diminuição no número de borregos esperados de 25% (100 borregos).
2. É necessário realizar pelo menos um exame serológico de forma a verificar quais os animais que sofreram infecções e produziram anticorpos. Realiza-se, por exemplo, o ELISA indirecto, que custa 7€/ovelha (total 3500 €).

A diminuição no número de borregos reduz o proveito da exploração para um total de 59700 €, e a necessidade de identificar as ovelhas afectadas através de exames laboratoriais aumenta os custos em 3500 €. Deste modo teremos proveito final, após um surto de BDV, de 56200€.

Como lucro total teórico de uma exploração de ovinos em Portugal, gerida através de um sistema tradicional de produção e após um surto de BDV que cause uma quebra de 25% da produção, teremos cerca de **8700 €**.

Um surto de BDV, dependendo da estirpe, pode causar uma diminuição de 54% dos lucros de uma exploração de ovinos em Portugal.

A “Border Disease” é responsável por perdas económicas na produção animal e nas suas indústrias associadas. Embora esta doença seja reconhecida mundialmente por causar diminuições nas produções de carne e de leite, em pequenos ruminantes, em Portugal não existe nenhum estudo efectuado sobre BD, o que resulta no desconhecimento do verdadeiro impacto desta doença nos efectivos e nas populações do nosso país.

Neste trabalho realizou-se um estudo epidemiológico através da determinação da seroprevalência de BDV. Deste modo, pesquisou-se anticorpos séricos em amostras sanguíneas recolhidas em explorações de pequenos ruminantes, com um sistema de pastoreio tradicional semi-extensivo, distribuídas pela região do Baixo Alentejo.

3. Objectivo

O presente estudo teve como objectivo principal estudar a seroprevalência de “Border Disease” na região do Baixo Alentejo, de forma a verificar se ocorre circulação viral nas explorações de pequenos ruminantes desta região. Como objectivos complementares relacionou-se seroprevalência com raça, localização geográfica da exploração, coabitação com bovinos e dimensão da exploração.

4. Material e Métodos

4.1. Caracterização da Área Geográfica, das Explorações e dos Animais

O estudo incidiu em 29 explorações de regime tradicional semi-extensivo, distribuídas por diversas localidades do Distrito de Beja (Tabela 2). Das 29 explorações, 27 são explorações de ovinos com aptidão de carne e 2 de caprinos com aptidão de leite. A população consistiu num total de 197 animais, dos quais 182 ovinos e 15 caprinos (Tabela 3). Os efectivos das explorações do estudo variam de 16 a 568 animais.

Tabela 2: Distribuição do número de explorações, amostras de sangue obtidas e população representada por localidade no distrito de Beja.

Localidade	Nº de Explorações	Animais Analisados	População Representada
Albernôa	1	5	26
Aljustrel	1	5	80
Alvito	2	15	506
Baleizão	1	5	100
Beja	3	20	485
Beringel	1	7	115
Cabeça Gorda	1	5	30
Mértola	1	10	431
Moura	1	10	300
Neves	3	20	676
Quintos	3	20	530
São Matias	1	5	40
Salvada	2	15	568
Santa Clara de Louredo	2	20	1068
São Marcos	1	10	220
Trigaches	2	10	63
Trindade	1	5	16
Viana do Alentejo	1	5	85
Vila Frades	1	5	50
Total	29	197	5389

Tabela 3: Distribuição da população e amostras de sangue por espécie.

Espécie	Nº de Explorações	Número de Amostras	População Representada
Ovinos	27	182	4873
Caprinos	2	15	516
Total	29	197	5389

As raças dos animais das explorações em estudo distribuem-se da seguinte forma: rebanhos cruzados (58,6%; 17/29) e rebanhos de raça pura (41,4%; 12/29) (Figura 14).

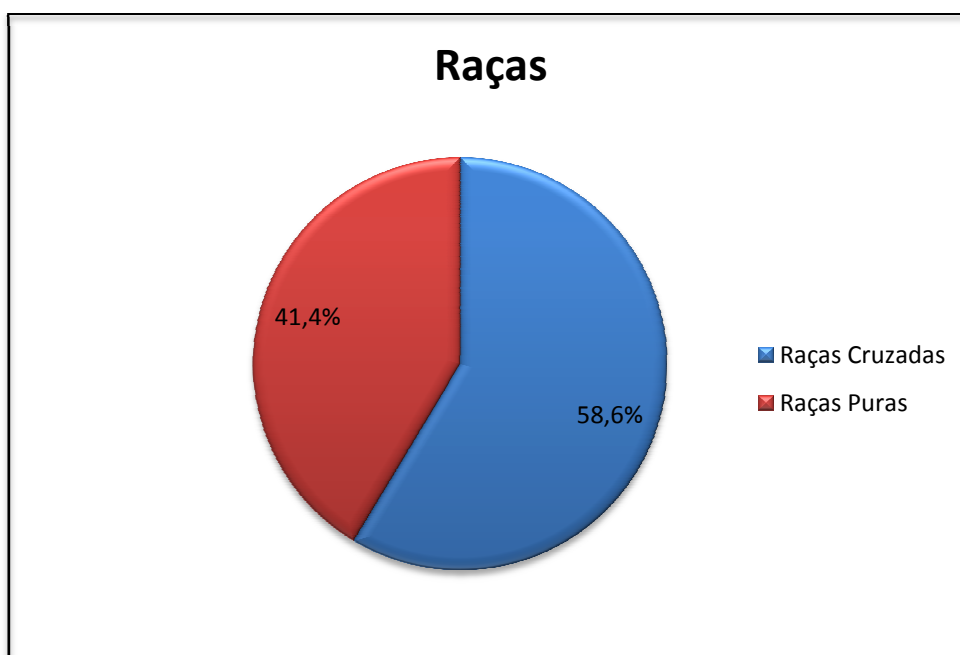


Figura 14: Percentagem de raças puras e raças cruzadas das explorações analisadas no estudo.

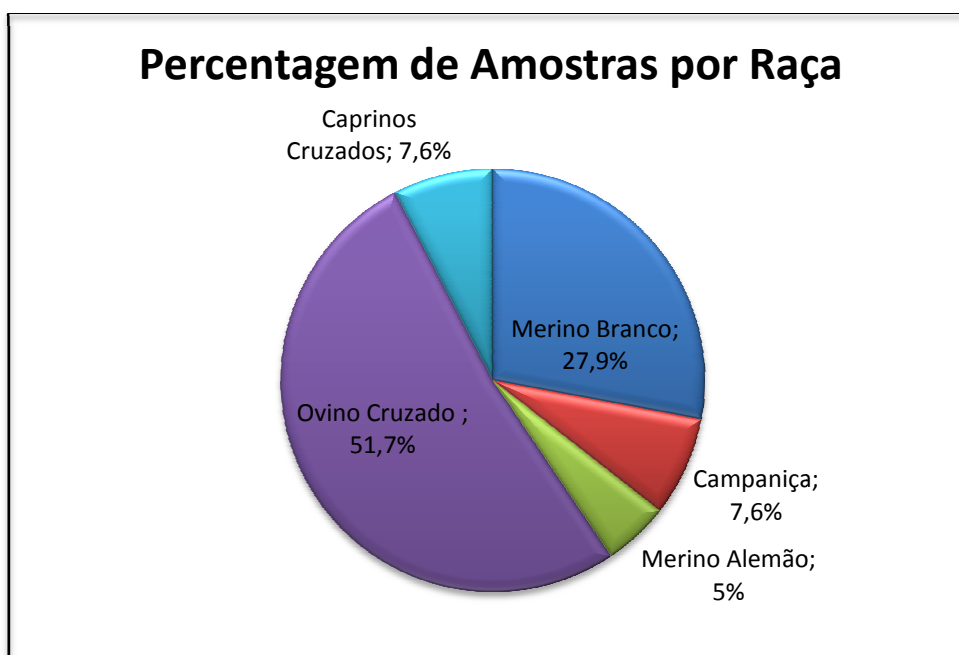
No estudo a pesquisa incidiu em:

- 9 Explorações da raça Merino Branco, das quais foram recolhidas 55 amostras (27,9%);
- 2 Explorações da raça Campaniça, das quais foram recolhidas 15 amostras (7,6%);
- 1 Exploração da raça Merino Alemão, da qual foram recolhidas 10 amostras (5%);
- 15 Explorações de ovinos cruzados, das quais foram recolhidas 102 amostras (51,7%);
- 2 Explorações de caprinos cruzados, das quais foram recolhidas 15 (7,6%).

Estes dados podem ser verificados na tabela 4 e na figura 15.

Tabela 4: Número de amostras obtidas por espécie e pelas raças sujeitas ao estudo.

		Raça	Nº de Explorações	Nº de Amostras
Espécie	Ovino	Merino Branco	9	55
		Campaniça	2	15
		Merino Alemão	1	10
		Cruzados	15	102
	Caprino	Cruzados	2	15
Total			29	197

**Figura 15:** Percentagem das amostras analisadas pelas diversas raças de ovinos e caprinos, sujeitas ao estudo.

4.1.1. Selecção de amostras a recolher por exploração

Para a determinação do número mínimo de amostras a recolher num determinado efectivo animal, considerou-se a dimensão do efectivo de cada exploração. O número de amostras para análise foram calculadas através da fórmula abaixo apresentada (Toma *et al.*, 2004).

$$n = \left[1 - (\alpha)^{1/D} \right] \times \left[N - \frac{D}{2} \right] + 1$$

Figura 16: Fórmula de cálculo do número mínimo de amostras. (Adaptado de Toma *et al.*, 2004).

Legenda da fórmula: n = dimensão da amostra; α = probabilidade de não ter nenhum doente entre os n animais tirados à sorte de uma população N ; N = dimensão da população; D = número de unidades doentes na população.

Ao aplicar a fórmula em cada exploração obteve-se um total de 197 amostras. Foi considerado um intervalo de confiança de $\alpha=95\%$, e uma prevalência esperada de $P=50\%$ para cada exploração em estudo. Esta prevalência esperada foi assumida inicialmente, uma vez que não existe nenhuma informação sobre a prevalência da doença na área sujeita ao estudo, o que se traduz na probabilidade de 50% de um animal estar ou não infectado (Toma *et al.*, 2004).

O número de amostras a recolher por exploração varia em função do seu efectivo. Para explorações com um efectivo até 100 animais, foram colhidas amostras de 5 animais, com um efectivo de 101 a 200 animais, 7 amostras, e para efectivos superiores a 200 animais, 10 amostras.

Como pode ser verificado na tabela 5, obtiveram-se 18 explorações com 5 amostras, 1 exploração com 7 amostras, e 10 explorações com 10 amostras.

Tabela 5: Distribuição das explorações do Baixo Alentejo, sujeitas ao estudo, pelos 3 diferentes tipos de amostragem

Número de Amostras por Exploração	5 Amostras	7 Amostras	10 Amostras
Número de Explorações	18	1	10

4.1.2. Colheita e envio das amostras

A recolha das amostras foi realizada em simultâneo com as intervenções sanitárias de rotina. A amostragem foi efectuada de forma aleatória em animais sem qualquer tipo de doença clínica aparente e em animais com idade superior a 12 meses.

Colheram-se amostras de sangue a partir da veia jugular para tubos de vácuo sem anticoagulante, utilizando agulhas de 18G descartáveis e esterilizadas, por cada animal. Após a recolha das amostras, os tubos foram mantidos em recipientes de isolamento térmico, até serem armazenados num frigorífico a uma temperatura controlada entre 2°C e 4°C. Foi atribuído a cada tubo um número que corresponde à exploração de origem. Este número está associado às características de cada exploração, concretamente o nome da exploração, a marca de exploração (marca sanitária), a sua localização, a raça e tamanho do efectivo e se existe ou não coabitação com bovinos. Estas características não estão descritas neste trabalho de forma a manter o anonimato. Após a identificação das amostras, estas foram enviadas em recipientes de isolamento térmico contendo placas de gelo para o laboratório a fim de serem realizadas análises serológicas.

A colheita e processamento das amostras foram realizados durante o período de estágio curricular, nos meses de Janeiro, Fevereiro, Março e Abril de 2011.

4.1.3. Análises serológicas - ELISA

Para a pesquisa de anticorpos anti BDV nas amostras obtidas, foi utilizada a técnica ELISA indirecto, através de kits de diagnóstico com o nome de SVANOVIR® Border Disease Virus BDVAb ELISA Kit (Svanova). O teste pesquisa anticorpos específicos de BDV (IgG₁) e pode ser realizado a partir de amostras de soro ou de leite. Segundo o fabricante o teste apresenta uma especificidade de 93,7% e uma sensibilidade de 94,3% em ovinos, já em caprinos apresenta uma especificidade e sensibilidade de 100%. A análise laboratorial realiza-se em placas de microtitulação que contêm poços, sendo estes revestidos com antígenos de BDV. Ao adicionar a amostra, os anticorpos (se presentes na amostra de teste) ligam-se aos antígenos no poço. É então adicionada aos poços das placas de microtitulação uma solução enzimática conjugada HRP (horseradish peroxidase), que se liga aos complexos antígeno-anticorpo. Efectua-se uma lavagem para remoção dos componentes soltos antes de adicionar-se o substrato da solução enzimática conjugada. A conversão do substrato pela enzima conjugada produz uma coloração azul que evidencia que o resultado do teste é positivo. O resultado pode ser interpretado a olho nu ou através de um espectrofotómetro,

onde a densidade óptica (DO) é medida num comprimento de onda de 450nm. A reacção é interrompida através de um reagente de interrupção mudando a coloração para amarelo.

4.1.3.1. Protocolo Laboratorial

1. Todos os reagentes devem estar à temperatura ambiente (18°C-25°C) antes da realização do teste.
2. Lavar 3 vezes as placas de microtitulação utilizando a solução tampão “PBS Tween Buffer”: em cada ciclo de lavagem encher os poços das placas com a solução, escorrer a placa e secá-la de forma a garantir que não fique nenhum resíduo do fluido.
3. Adicionar 100 µm da solução tampão em cada poço da placa de microtitulação.
4. Adicionar 4 µm do soro de controlo positivo e 4 µm do soro de controlo negativo respectivamente em 2 poços, previamente escolhidos, revestidos de antígenos de BDV e para 2 poços de controlo de antígeno correspondentes. Para fins de confirmação é aconselhável realizar a técnica aos controlos em duplicado.
5. Adicionar 4 µm de soro da amostra a 1 poço revestido de antígeno de BDV e a 1 poço de controlo de antígeno correspondente. Para fins de confirmação é aconselhável realizar a técnica às amostras em duplicado.
6. Homogeneizar o conteúdo dos poços com uma suave agitação da placa. Cobrir a placa de microtitulação e incubar a 37°C durante 1 hora.
7. Repetir o passo 2.
8. Adicionar 100 µm da solução enzimática conjugada HRP a cada poço e incubar a 37°C durante 1 hora.
9. Repetir o passo 2.
10. Adicionar 100 µm da solução substrato a cada poço. Incubar durante 10 minutos à temperatura ambiente (18°C-25°C). Começar a contar o tempo quando o primeiro poço estiver cheio.
11. Parar a reacção adicionando 50 µm da solução de interrupção a cada poço e agitar. Adicionar na mesma ordem de poços do passo 10.
12. Medir a densidade óptica (DO) dos controlos e das amostras num espectrofotómetro a 450 nm. Medir a DO 15 minutos após a adição da solução de interrupção de forma a prevenir flutuações nos valores.

4.1.4. Validação e cálculos

Para se proceder à interpretação dos resultados obtidos na técnica é necessário realizar um cálculo de forma a obter um valor de densidade óptica corrigida (DO_{corr}). Desta forma é necessário calcular a DO_{corr} das amostras e dos controlos positivos e negativos. É utilizada a seguinte fórmula:

$$DO_{BDV} - DO_{Controlo} = DO_{corr}$$

Figura 17: Fórmula utilizada para obter a densidade óptica corrigida da amostra.

Legenda da fórmula: DO_{BDV} = Densidade óptica obtida do soro da amostra nos poços revestidos com antígenos BDV; $DO_{Controlo}$ - Densidade óptica obtida dos poços com controlo de antígeno correspondentes.

Para assegurar a validade do teste o soro de controlo positivo deve ter uma DO_{corr} maior do que 1,0 e o soro de controlo negativo deve ter uma DO_{corr} inferior a 0,15. Para testes inválidos o ensaio deve ser repetido.

Outro cálculo necessário de realizar é a determinação do “Cut Off”, ou seja, do valor de referência a partir do qual os resultados obtidos serão positivos ou negativos. O cálculo é obtido através da DO_{corr} do soro de controlo negativo através da fórmula:

$$A = DO_{corr} \text{ do soro de controlo negativo } \times 2.0$$

Se $A > 0,25$: use A como “Cut Off”

Se $A < 0,25$: use 0,25 como “Cut Off”

Figura 18: Fórmula utilizada para obter o “Cut Off” da técnica laboratorial utilizada.

4.1.5. Classificação dos resultados

- Todas as amostras com DO_{corr} maiores que o “Cut Off” são consideradas positivas.
- Todas as amostras com DO_{corr} menores que o “Cut Off” são consideradas negativas.

No presente estudo considerou-se o “Cut Off” de 0,25. Deste modo, a classificação dos resultados das amostras pode ser verificada na tabela 6 (exemplo em anexo I).

Tabela 6: Classificação dos resultados das amostras.

DO _{corr} da Amostra	> 0,25	< 0,25
Interpretação	Positivo	Negativo

4.1.6. Análise Estatística

Os resultados das análises serológicas foram analisados por exploração, por localização das explorações, pelo número de animais presente no efectivo, pela raça dos animais sujeitos ao estudo e pela coabitação com bovinos, com recurso ao programa informático Microsoft EXCEL para realização de análise descritiva (média, mediana, desvio-padrão, frequências) e com recurso ao programa SPSS para Windows 17.0® para análise exploratória dos dados (teste de Fisher, teste de Pearson e teste do Qui-quadrado).

4.2. Resultados

A análise descritiva dos dados resultantes das análises serológicas está apresentada na tabela 7.

Tabela 7: Análise estatística global dos resultados obtidos.

Análise Estatística Global - Resultado de ELISA BDV	
Indicadores	Resultados
Nº de Elementos	197
Resultados Positivos (%)	5%
Resultados Negativos (%)	95%
Valor Máximo	1,603
Valor Mínimo	-1,337
Média	-0,12
Variância	0,11
Desvio Padrão	0,34
Desvio Médio	0,21
Mediana	-0,08
Fisher	-0,116
Qhi-square	1
Pearson	1

- **Fisher**, o qual apresentou o resultado de $-0,116$, indica que os resultados têm distribuição assimétrica negativa.
- **Quiquadrado** com valor 1 indica que o estudo efectuado tem relevância estatística.
- **Pearson** com resultado 1 indica que todas as variáveis utilizadas são estatisticamente analisáveis e podem ser relacionadas.

4.2.1. Seroprevalência das Explorações

Após a análise das amostras, obtiveram-se os seguintes resultados:

- Das 29 explorações sujeitas ao estudo, 6 apresentaram pelo menos 1 amostra com resultado positivo obtendo assim uma percentagem de 20,7% (6/29) de explorações com resultados positivos a anticorpos anti - BDV (Figura 19).

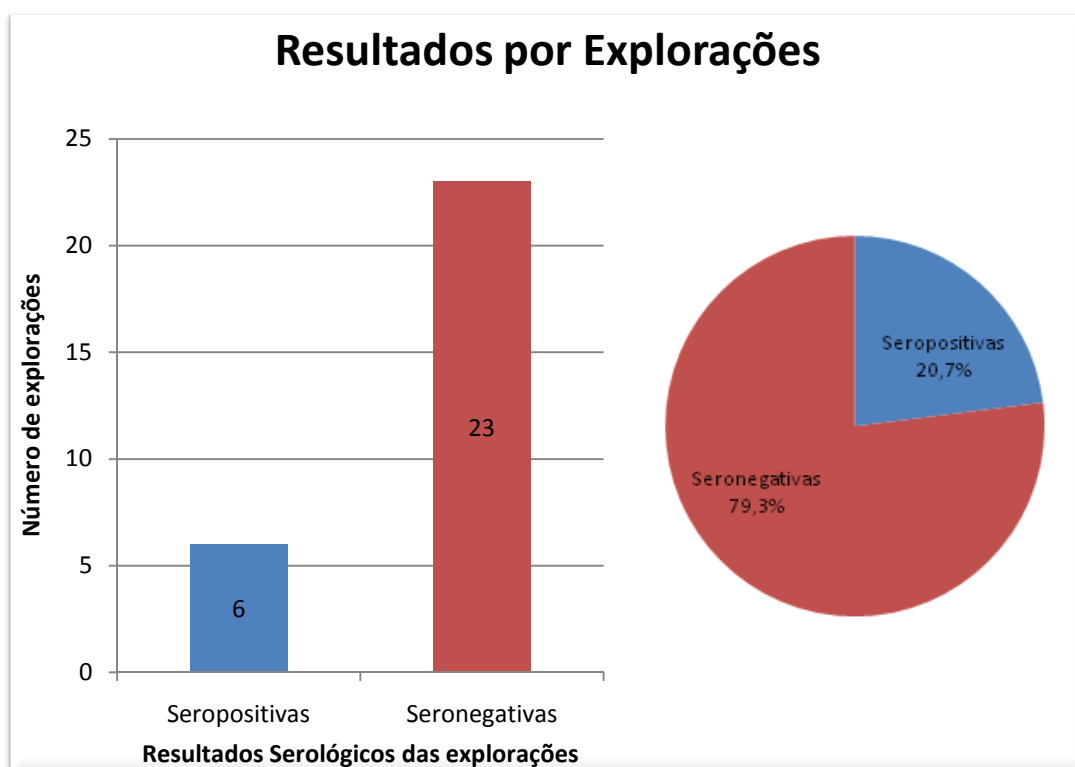


Figura 19: Distribuição das explorações do Baixo Alentejo, sujeitas ao estudo, em função da seropositividade ou seronegatividade a BDV.

4.2.2. Seroprevalência das Amostras

Dos 197 soros recolhidos 10 soros tiveram resultados seropositivos verificando-se assim uma percentagem de 5% de amostras seropositivas. Os restantes 187 soros foram seronegativos representando 95% das amostras sujeitas a análise (Figura 20).

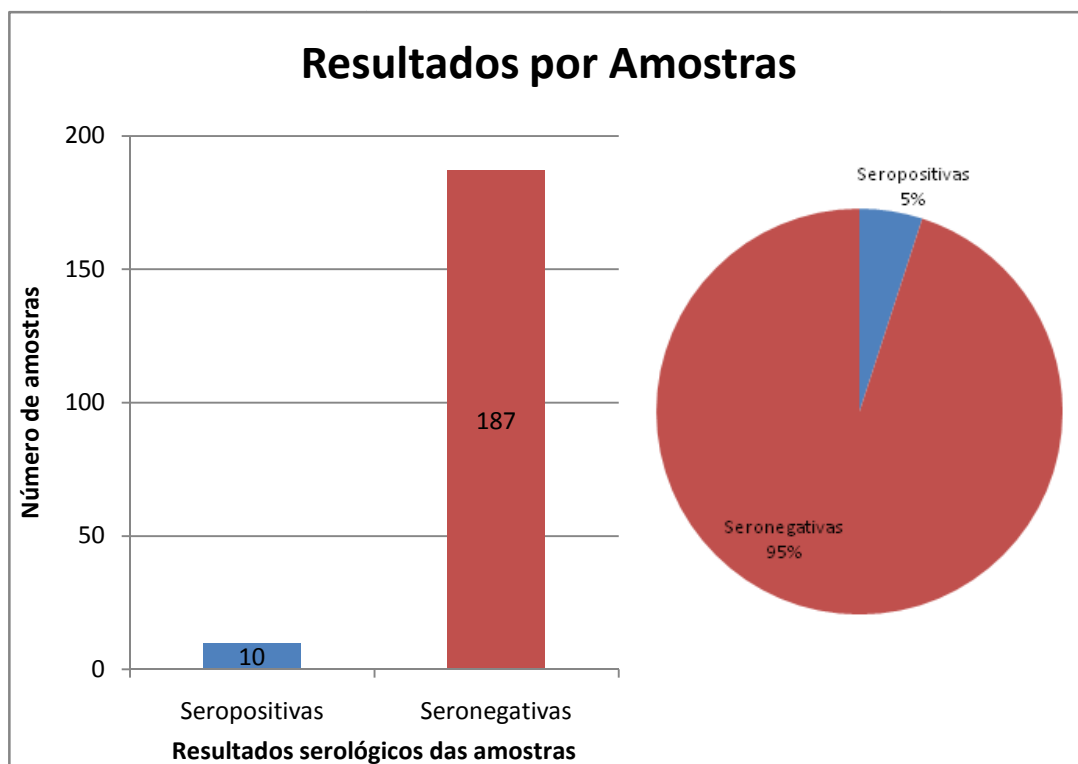


Figura 20: Distribuição das amostras do Baixo Alentejo, sujeitas ao estudo, em função da seropositividade ou seronegatividade a BDV.

Na figura 21 é possível verificar o número de amostras serpositivas e seronegativas das 6 explorações que apresentaram resultados serpositivos.

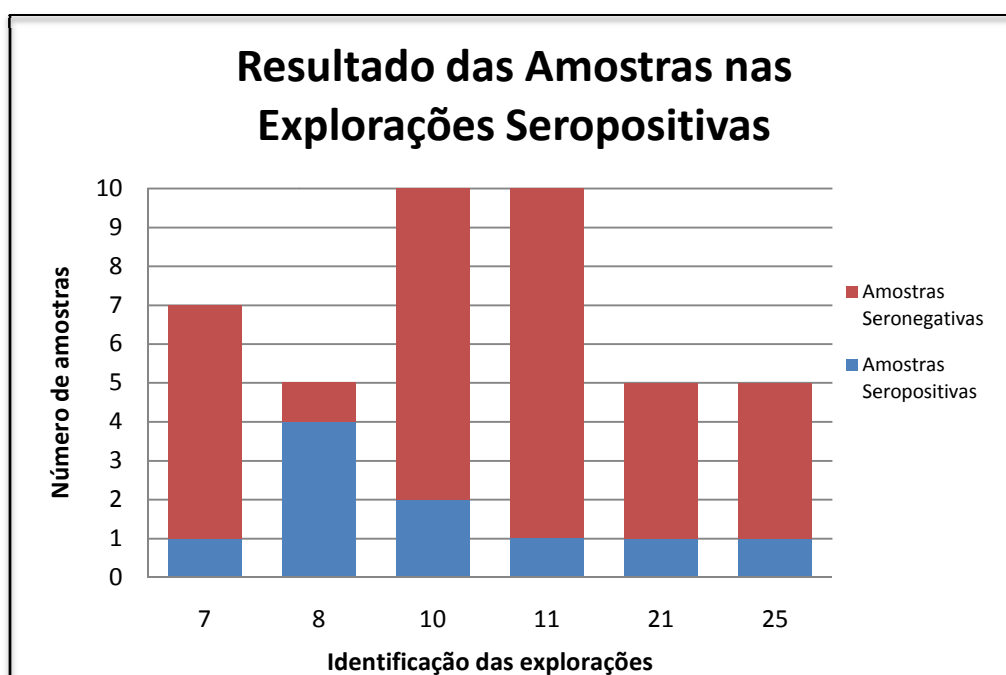


Figura 21: Número de amostras serpositivas e seronegativas das 6 explorações que apresentaram resultados serpositivos no presente estudo.

4.2.3. Relação entre Seroprevalência e Raça dos Animais

Nas explorações de raça cruzada (ovinos e caprinos), duas em 17 explorações apresentaram resultados seropositivos. Nas explorações de raça pura, quatro em 12 explorações apresentaram resultados seropositivos.

Nas nove explorações de raça Merino Branco, três (33%) apresentaram resultados seropositivos. Desta raça foram colhidas 55 amostras com seis resultados seropositivos. Das duas explorações de Campaniças, uma (50%) apresentou resultados seropositivos. Foram colhidas 15 amostras da raça Campaniça com dois resultados seropositivos. A exploração de Merino Alemão não apresentou resultados seropositivos. Das 15 explorações de Ovinos Cruzados, duas (13%) apresentaram resultados seropositivos. Das 102 amostras colhidas de Ovinos Cruzados duas foram seropositivas. As duas explorações de Caprinos Cruzados não apresentaram resultados seropositivos. Estes resultados são apresentados na figura 22 e na tabela 8.

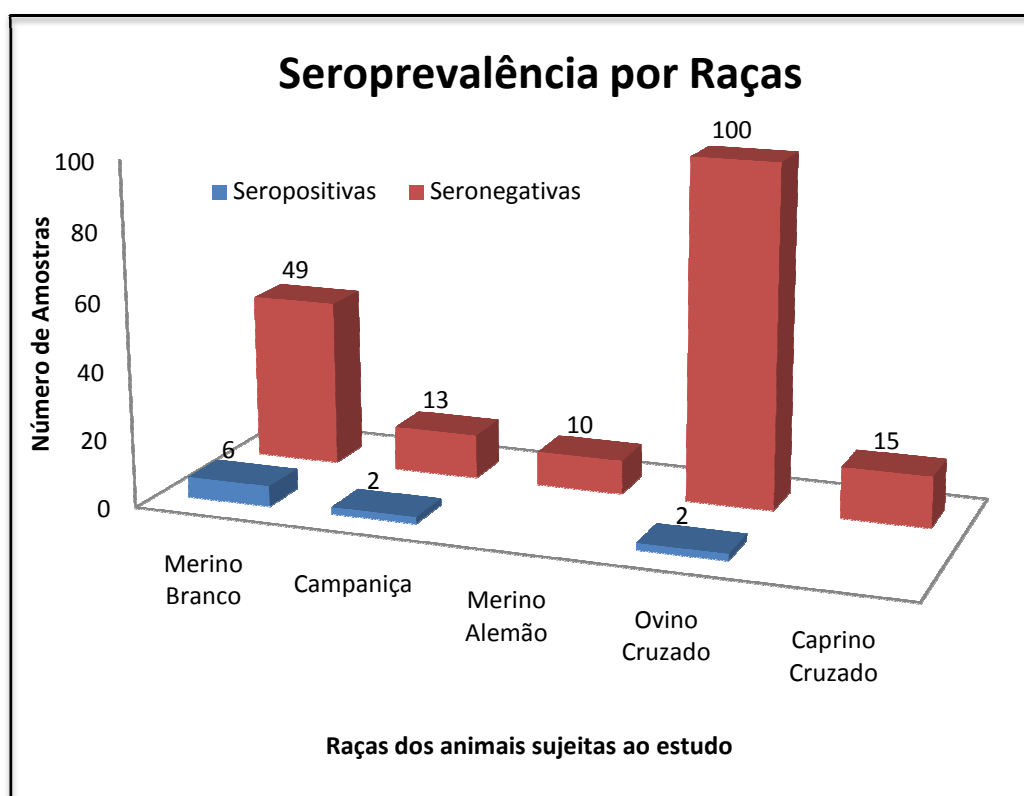


Figura 22: Número de amostras seropositivas e seronegativas por cada uma das raças sujeitas ao estudo.

Tabela 8: Número de explorações seropositivas e seronegativas a BDV segundo a raça dos animais no estudo.

Raça da Exploração	Números de explorações		
	Seropositivas	Seronegativas	Total
Merino Branco	3	6	9
Campaniça	1	1	2
Merino Alemão	0	1	1
Ovino Cruzado	2	13	15
Caprino Cruzado	0	2	2
Total	6	23	29

4.2.4. Relação entre Seroprevalência e Dimensão do Efectivo de cada Exploração

Os efectivos das explorações sujeitas ao estudo apresentavam diferentes dimensões, o que levou a um número diferente de amostras, de acordo com a tabela 5.

Das 18 explorações de pequena dimensão, três (16,6%) apresentaram resultados seropositivos. Nestas explorações, seis em 90 animais apresentaram resultados seropositivos. Na única exploração de média dimensão presente no estudo apenas um animal em sete resultou seropositivo. Das dez explorações de grande dimensão, duas (20%) apresentaram resultados seropositivos. Nestas explorações, três em 100 animais apresentaram resultados seropositivos (Figura 23 e Tabela 9).

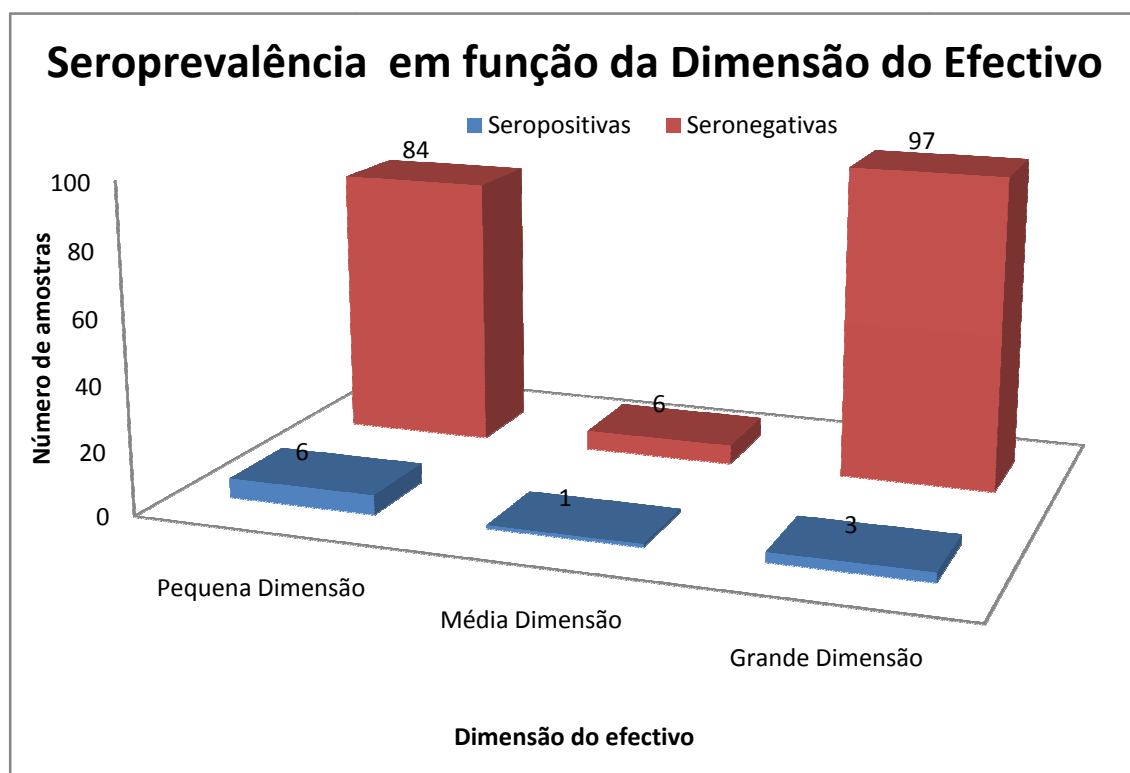


Figura 23: Número de amostras seropositivas e seronegativas a BDV, por cada grupo de dimensões de efectivos das explorações do Baixo Alentejo, sujeitas ao estudo.

Tabela 9: Número de explorações seropositivas e seronegativas a BDV consoante o tamanho do seu efectivo.

Tamanho do Efectivo	Números de explorações		
	Seropositivas	Seronegativas	Total
Pequena Dimensão	3	15	18
Média Dimensão	1	0	1
Grande Dimensão	2	8	10
Total	6	23	29

4.2.5. Relação entre Seroprevalência e Explorações com Coabitação com Bovinos

Outro objectivo secundário proposto no estudo foi relacionar resultados seropositivos em explorações de ovinos e caprinos com coabitação de bovinos, na mesma exploração. Assim, das sete explorações onde se verificou coabitação com bovinos, três apresentaram resultados seropositivos a BDV em que das 40 amostras, cinco foram seropositivas. Das restantes 22 explorações apenas com pequenos ruminantes, três apresentaram resultados seropositivos (Figura 24 e Tabela 10).

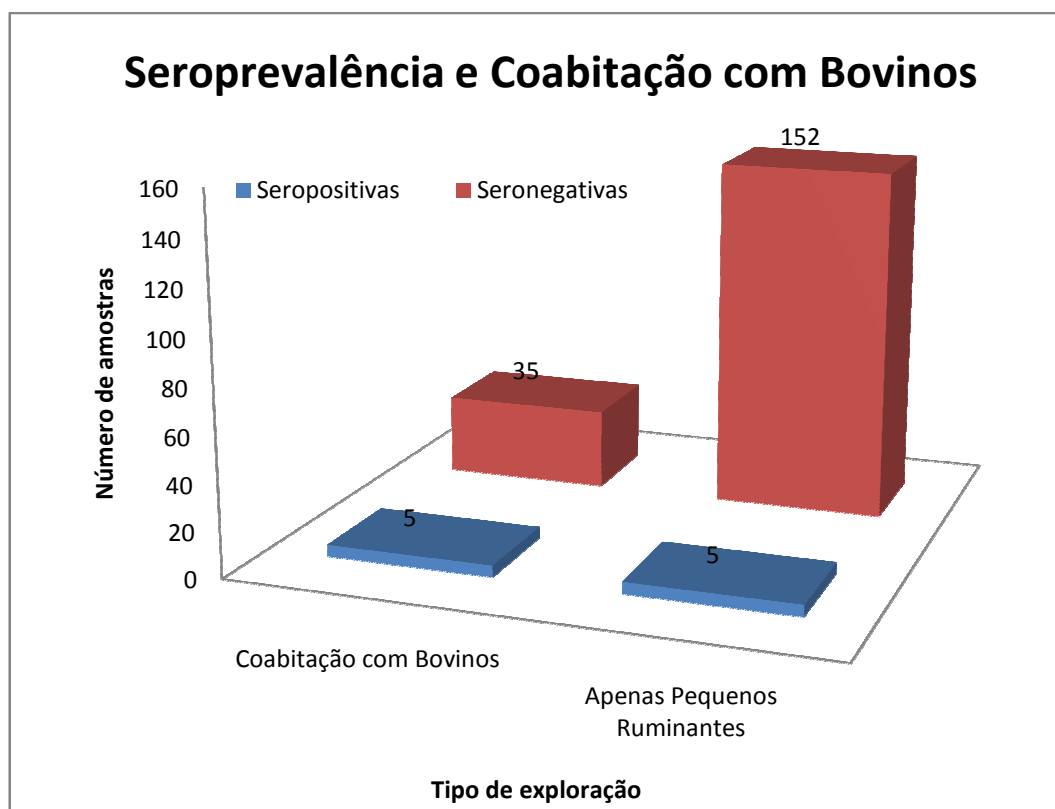


Figura 24: Número de amostras seropositivas e seronegativas a BDV, em explorações que os animais sujeitos ao estudo coabitam com bovinos e em explorações onde habitam apenas os pequenos ruminantes sujeitos ao estudo.

Tabela 10: Número de explorações seropositivas e seronegativas a BDV, em explorações que os animais sujeitos ao estudo coabitam com bovinos e em explorações onde habitam apenas os pequenos ruminantes sujeitos ao estudo.

Tipo de Exploração	Número de Explorações		
	Seropositivas	Seronegativas	Total
Coabitação com Bovinos	3	4	7
Apenas com Pequenos Ruminantes	3	19	22
Total	6	23	29

4.2.6. Relação entre Seroprevalência e Localização Geográfica

As explorações sujeitas ao estudo localizam-se em diversas localidades do distrito de Beja. Como objectivo secundário foi proposto relacionar a presença de anticorpos contra BDV e a localização geográfica das explorações, de forma a verificar se existe alguma área com maior incidência (Figura 25, Figura 26 e Tabela 11).

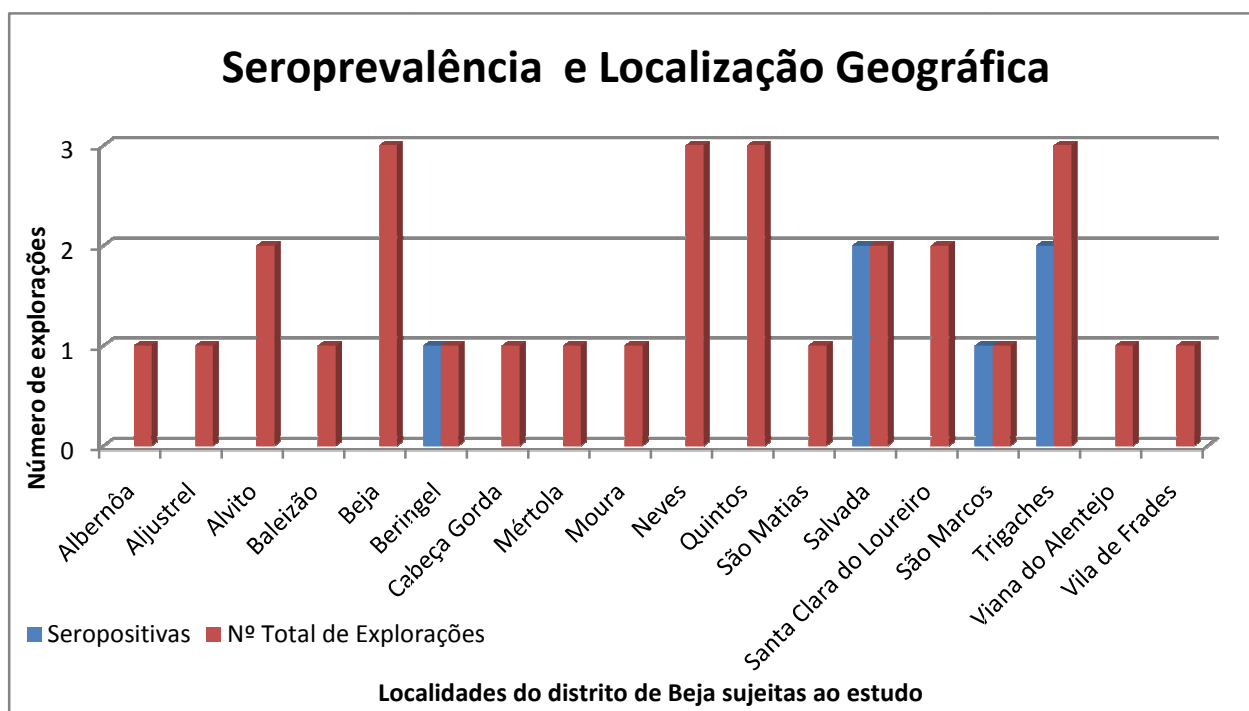


Figura 25: Número total de explorações sujeitas ao estudo e explorações com resultados seropositivos, por localidade no distrito de Beja.

Tabela 11: Número total de explorações sujeitas ao estudo e explorações com resultados seropositivos, por localidade no distrito de Beja.

Localização das Explorações	Nº Total de Explorações	Explorações com Resultados Positivos
Albernôa	1	
Aljustrel	1	
Alvito	2	
Baleizão	1	
Beja	3	
Beringel	1	1
Cabeça Gorda	1	
Mértola	1	
Moura	1	
Neves	3	
Quintos	3	
São Matias	1	
Salvada	2	2
Santa Clara do Loureiro	2	
São Marcos	1	1
Trigaches	3	2
Viana do Alentejo	1	
Vila de Frades	1	
Total	29	6

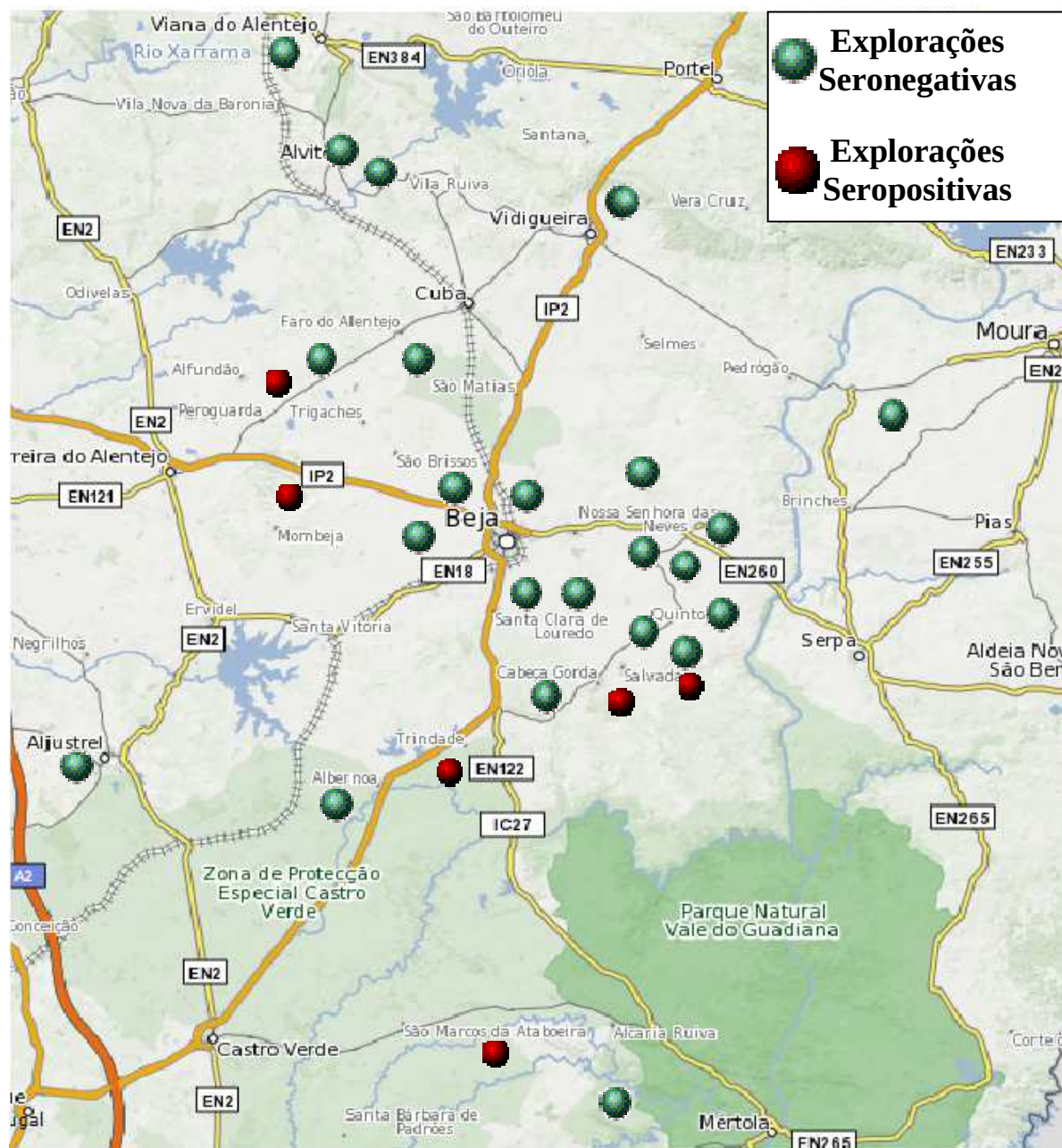


Figura 26: Distribuição Geográfica das Explorações seropositivas e seronegativas sujeitas ao estudo, no distrito de Beja.

5. Discussão

O teste utilizado no estudo para determinar a seroprevalência de anticorpos específicos de BDV (IgG1) foi o teste ELISA indirecto. Foram utilizados kits de diagnóstico com o nome de SVANOVIR® Border Disease Virus BDVAb ELISA Kit, fabricado pela empresa Svanova. Segundo o fabricante o teste apresenta uma especificidade de 93,7% e uma sensibilidade de 94,3% em ovinos, e uma especificidade e sensibilidade de 100% em caprinos. Deste modo, no caso dos ovinos, existe a probabilidade de 6,3% de haver algum resultado falso negativo e de 5,7% de haver um resultado falso positivo. Outra limitação do teste escolhido é o facto de não diferenciar a estirpe de BDV nas amostras positivas.

A ausência de estudos sobre a prevalência de BDV em Portugal levou a considerar a possibilidade de 50% da população do estudo estar infectada com a doença (valor padrão neste tipo de situações), o que determinou o número de amostras a recolher por exploração (Toma *et al.*, 2004).

Os valores preditivos (probabilidade de, perante um resultado positivo ou negativo, existir ou não doença) de um teste variam em dependência da prevalência assumida, de acordo com a tabela 12, sendo a prevalência de uma doença o número de animais com doença sobre a população em risco.

Tabela 12: Propriedades dos testes de diagnóstico e fórmula de cálculo dos valores preditivos (Adaptado de Almeida Filho & Rouquayrol, 1990).

	Animais com doença	Animais sem doença	Total	Valor preditivo positivo (VPP)	Valor preditivo negativo (VPN)
Teste positivo	Verdadeiros positivos (VP)	Falsos positivos (FP)	Totais positivos (TP)	$\frac{VP}{TP}$	$\frac{VN}{TN}$
Teste negativo	Falsos negativos (FN)	Verdadeiros negativos (VN)	Totais negativos (TN)		
Total	Totais doentes (TD)	Totais não-doentes (TND)	População em Risco		

Se consideramos a população em risco todos os animais do estudo (n=197), então o valor preditivo positivo do teste ELISA utilizado varia em função da prevalência assumida, de acordo com a tabela 13.

Tabela 13: Variação dos valores preditivos consoante a prevalência assumida na população em estudo (n=197).

	Animais com doença	Animais sem doença	Total	Valor preditivo positivo (VPP)	Valor preditivo negativo (VPN)
Teste positivo	92,9 36,8 7,5	6,2 10 12	99,1 46,8 19,5	93.7%	94.3%
Teste negativo	5,6 2,2 0,5	92,3 148 177	97,9 150,2 177,5	78.9%	98.5%
Total	98,5 39 8	98,5 158 189	197	38.5%	99.7%

Legenda: Valores para prevalência de 50%; Valores para prevalência de 20%; Valores para prevalência de 4%. Especificidade de 93,7% e sensibilidade de 94,3% do teste ELISA, em ovinos.

Como se pode observar na tabela 13 o valor preditivo positivo do teste para uma prevalência de 4% é de apenas 38,5%. Isto significa que a probabilidade dos animais seropositivos no teste de ELISA indirecto estejam verdadeiramente infectados com BDV é de apenas 38,5%. No caso do valor preditivo negativo, o valor é de quase 100% o que indica que os animais seronegativos no teste de ELISA indirecto são verdadeiramente seronegativos a BDV. Tendo em conta que neste estudo 5% dos animais testaram positivo, e que não existe sintomatologia clínica reportada nestas explorações, assumir que a prevalência da doença na região do Baixo Alentejo é de 50%, foi de certa forma apostar no subdiagnóstico da doença por existirem poucos relatos de casos clínicos de BDV e poucos testes laboratoriais positivos nesta região do país, de forma a auxiliarem na definição deste valor epidemiológico. Assim, ao utilizar a fórmula para determinar o número de amostras a colher por exploração obteve-se um número reduzido de amostras a colher por exploração. O autor considera assim a assunção de 50% de prevalência de BDV nesta região de Portugal uma limitação deste estudo.

Se se tivesse assumido uma prevalência mais baixa para valores similares aos verificados em Espanha, nomeadamente entre 4 a 21% na região de Madrid (Álvarez *et al.*, 1989; Mainar-Jaime & Vázquez-Boland, 1999; Berriatua *et al.*, 2006), a amostra teria então de ser mais extensa, de acordo com a fórmula utilizada, para aumentar a probabilidade de encontrar os animais seropositivos. Contudo, os estudos efectuados no país vizinho

decorreram já há 23, 13 e 6 anos respectivamente e assumiu-se que a situação actual da doença, com as alterações no modo de produção e comércio de ovinos na Europa nas décadas passadas, não seria a mesma de então, mas sim de maior prevalência. Com este incremento estimado de prevalência seria de esperar que metade das amostras resultasse positiva e metade negativa, o que não se observou.

A seroprevalência obtida neste estudo foi de 5%, ou seja 10 em 197 animais apresentaram títulos de anticorpos anti-BDV. Das 29 explorações presentes no estudo, seis (20%) tinham pelo menos um animal seropositivo a BDV. Estes resultados estão de acordo com os resultados efectuados no nordeste de Espanha e na região de Madrid que mostraram que 4 a 21% em animais adultos e que entre 10 a 91% dos rebanhos são seropositivos (Álvarez *et al.*, 1989; Mainar-Jaime & Vázquez-Boland, 1999; Berriatua *et al.*, 2006) e em estudos serológicos efectuados noutras regiões do globo que demonstraram uma seroprevalência entre 5% e 50% (Nettleton *et al.*, 2000).

Todos os animais sujeitos ao estudo estavam em fase de reprodução (a partir dos 12 meses de idade), o que leva a assumir que os anticorpos maternos já não estariam em circulação e que as amostras seropositivas são indicativas de exposição directa ao agente. A determinação da seropositividade pode subestimar a actividade do agente em rebanhos infectados. Há casos de anticorpos presentes em circulação durante 485 dias em ovelhas, infectadas durante gestação (Huck *et al.*, 1975) e casos em que os anticorpos se tornam indetectáveis a partir dos 210 dias (Sawyer *et al.*, 1986).

A seroprevalência no presente estudo pode ser justificada pela inexistência de animais PI nas explorações sujeitas ao estudo, não só por terem uma alta mortalidade, mas também por estes serem eliminados dos efectivos precocemente. Outra justificação é a saída da maioria dos borregos para abate com idades precoces, uma vez que em Portugal os borregos saem para abate com idade e peso inferior à média mundial. Deste modo, os possíveis borregos PI e borregos em virémia de transição são eliminados precocemente das explorações de origem. Por outro lado, os sinais clínicos mais exuberantes desta afecção, borregos com alterações congénitas, não são observados nesta região. Este facto pode levar a perpetuar alguns animais PI que sobrevivam à idade neonatal. O registo de abortos não é muitas vezes efectuado, logo a sintomatologia mais comum de BDV nesta região, nomeadamente a diminuição da performance reprodutiva, não é diagnosticada, tendo como consequência a continuidade do agente na exploração. Por outro lado os animais PI, apesar de ser pouco provável estarem presentes nas explorações sujeitas ao estudo, são seronegativos,

logo não são detectados através de técnicas de detecção de anticorpos o que também contribuiu para a baixa seroprevalência verificada no estudo.

Não foi possível estabelecer uma relação entre seroprevalência de anticorpos anti-BDV e raças dos animais e dimensão dos efectivos sujeitos ao estudo. No caso da variável das raças dos animais houve maior contribuição de amostras para análise de animais cruzados e da raça merino branco comparativamente com a contribuição de amostras das restantes raças. No caso da dimensão do efectivo houve maior contribuição de amostras por parte de efectivos de grandes dimensões, enquanto houve apenas uma contribuição de amostra por parte de efectivos de média dimensão. Seria necessária uma maior uniformidade do número de amostras de cada raça e de cada tamanho de efectivo para uma melhor avaliação destas duas variáveis.

A localização geográfica das explorações sujeitas ao estudo revelou um padrão disperso sem qualquer tipo de aglomeração de resultados seropositivos. Isto pode dever-se ao facto de a área de estudo, nomeadamente o Baixo Alentejo e o modo de produção de pequenos ruminantes, serem bastante semelhantes nesta região, não podendo assim serem avaliados como variáveis significativas. Uma análise realizada em conjunto com amostras obtidas em locais, como por exemplo o norte do país, com condições climatéricas, terreno e modos de produção distintos do Baixo Alentejo, seria mais indicada de forma a verificar se existe relação entre a seroprevalência de BDV e a localização geográfica das explorações.

Na relação da seroprevalência com a coabitação com bovinos verificou-se, nas explorações sujeitas ao estudo, onde habitam apenas pequenos ruminantes, uma seroprevalência de 3,2% (5 amostras positivas em 157 amostras) enquanto nas explorações onde se verifica coabitação com bovinos uma seroprevalência de 12,5% (5 amostras positivas em 40 amostras). Conclui-se ser mais provável encontrar um animal seropositivo a BDV em explorações onde existe coabitação de pequenos ruminantes e bovinos do que em explorações onde habitem apenas pequenos ruminantes. Este facto pode ser justificado pelo facto dos bovinos serem os maiores reservatórios de pestivírus do mundo (Carlsson, 1991), podendo deste modo aumentar o número de animais excretores de BDV na exploração, e deste modo perpetuar a presença do agente na região (Nettleton *et al.*, 2008).

Por outro lado, as amostras positivas poderão ser falsos positivos de BDV uma vez que os pequenos ruminantes que coabitam com bovinos podem estar expostos ao BVDV e que os ovinos podem ser infectados pelos restantes pestivírus principalmente o BVDV e o CSFV (Nettleton *et al.*, 2008). Em alguns países a BD em ovinos tem como principal causa o

BVDV (Carlsson, 1991), podendo assim os resultados seropositivos verificados derivar de uma seroconversão após o contacto destes pequenos ruminantes com o BVDV.

6. Conclusão

A seroprevalência de “Border Disease” na região do Baixo Alentejo é baixa, 5%, mas existe. Nesta região do país, 20% dos rebanhos apresentaram animais seropositivos. É uma afecção muito provavelmente subdiagnosticada em Portugal, que aparenta ser desconhecida e desvalorizada por produtores, médicos veterinários e outras entidades do sector. A ausência dos sinais clínicos mais exuberantes nesta região, como borregos com alterações congénitas, não diminui a sua importância. A diminuição da performance reprodutiva, e como consequência a diminuição da produtividade, pode ter efeitos gravíssimos para o sector podendo levar à diminuição de 54% do lucro das explorações e consequentemente ao encerramento das mesmas.

Explorações de pequenos ruminantes em que se verifique coabitação com bovinos têm maior probabilidade dos seus animais serem seropositivos a BDV.

Este estudo contribui para o conhecimento da prevalência de “Border Disease” nesta região de Portugal, porém estudos futuros deverão ser realizados de forma a determinar a prevalência real da doença a partir de um maior número de amostras; qual a estirpe de BDV presente no Baixo Alentejo; a influência da coabitação entre ovinos e bovinos na seropositividade das populações ovinas a BDV; e qual o verdadeiro impacto económico que esta doença provoca nos rebanhos de pequenos ruminantes nesta região do país.

7. Bibliografia

- Adler, B., De la Peña Moctezuma, A. (2010). *Leptospira* and leptospirosis. *Veterinary Microbiology*. v. 149, n 3-4, p.287-296.
- Almeida Filho, N., M. Z. Rouquayrol. (1990) *Introdução à Epidemiologia Moderna*. Salvador, Apce Produtos do Conhecimento e ABRASCO.
- Álvarez, M., Prieto, M., Muñoz, M., Cármenes, P. (1989). Prevalencia de la infección por pestivirus (Border disease) en ovinos de las regiones castellano-leonesa y asturiana. *Med. Vet.* 6, 353 – 355.
- Anderson, C.A., Higgins, R.J., Smith, M.E., Osburn, B.I., (1987). Virus induced decrease in thyroid hormone levels with associated hypomyelination. *Laboratory Investigation*. 57(2): 168-75.
- Arnal, M., Fernandez-de-Luco, D., Riba, L., Maley, M., Gilray, J., Willoughby, K., Vilcek, S., Nettleton, P.F. (2004). A novel pestivirus associated with deaths in Pyrenean chamois (*Rupicapra pyrenaica pyrenaica*). *Journal of General Virology*. 85(12): 3653–3657.
- Arricau-Bouvery, N., Rodolakis, A. (2004). Is Q Fever an emerging or re-emerging zoonosis? *Veterinary Research*, 34(4):423-433.
- Babak. (2007). Imagem obtida em [http:// www.theriogenology.multiply.com /photos/album/31](http://www.theriogenology.multiply.com/photos/album/31).
- Barlow, R.M., Patterson, D.S.P. (1982). Border Disease of sheep: A virus induced teratogenic disorder. *Advances in Veterinary Medicine*. 36, 1-87.
- Becher, P., Orlich, M., Shannon, A.D., Horner, G., König, M., Thiel, H.-J. (1997). Phylogenetic analysis of pestiviruses from domestic and wild ruminants. *Journal of General Virology*. 78 (Pt 6): 1357-66.
- Becher, P., Orlich, M. & Thiel, H.-J. (1998). Complete genomic sequence of border disease virus, a pestivirus from sheep. *Journal of Virology*. 72(6): 5165-73.
- Becher, P., Shannon, A.D., Tautz, N., Thiel, H.-J. (1994). Molecular characterization of border disease virus, a pestivirus from sheep. *Virology*. 198 (2): 542–551.
- Becher, P., König, M., Paton, D.J., Thiel, H.-J. (1995). Further characterization of border disease virus isolates: evidence for the presence of more than three species within the genus pestivirus. *Virology*. 209 (1): 200–206.

- Becher, P., Avalos Ramirez, R., Orlich, M., Cedillo Rosales, S., Kosmidou, A., König, M., Schweizer, M., Stalder, H., Schirmeier, H., Thiel, H.J. (2003). Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: implications for classification. *Virology*. 311 (1): 96–104.
- Benjamini, E., Sunshine, G., Coico, R. (2002). *Imunologia* (4ªed) Guanabara Koogan, Brazil.
- Berriatua, E., Barandika, J., Aduriz, G., Atxaerandio, R., Garrido, J., García-Pérez, A.L. (2004). Age-specific seroprevalence of Border disease virus and presence of persistently infected sheep in Basque dairy-sheep flocks. *Veterinary journal*. 168 (3): 336-42.
- Berriatua, E., Barandika, J.F., Aduriz, G., Hurtado, A., Estevez, L., Atxaerandio, R., Garcia-Perez, A.L., 2006. Flock-prevalence of border disease virus infection in Basque dairy-sheep estimated by bulk-tank milk analysis. *Vet. Microbiol*. 118, 37–46.
- Bonniwell, M. A., Nettleton, P. F., Gardiner, A. C., Barlow, R. M., Gilmour, J. S. (1987). Border disease without nervous signs or fleece changes. *Veterinary Record* 120(11): 246-249.
- Bradley, R. (1978). Hereditary “daft lamb” disease of border leicester sheep: The ultrastructural pathology of the skeletal muscles. *The Journal of Pathology*. 125(4): 205-212.
- Brun A., Lacoste F., Reynaud G., Kato F. & Saint-Marc B. (1993). Evaluation of the potency of an inactivated vaccine against border disease pestivirus infection in sheep. In: Edwards S., *Proceedings of the Second Symposium on Pestiviruses*, (Pp 257—259). Fondation Marcel Merieux, Annecy, France.
- Bruschke, C.J., Van Oirschot, J.T., Van Rijn, P.A. (1999). An experimental multivalent bovine virus diarrhea virus E2 subunit vaccine and two experimental conventionally inactivated vaccines induce partial fetal protection in sheep. *Vaccine*. 17(15-16): 1983-1991).
- Caffrey, J.F., Dudgeon, A.M., Donnelly, W.J., Seahan, B.J., Atkins, G.J. (1997) Morphometric analysis of growth retardation in fetal lambs following experimental infection of pregnant ewes with border disease virus. *Research in veterinary science*. 62(3): 645-648.
- Campbell, J.R., Radostits, O.M., Wolfe, J.T., Janzen, E.D. (1995). An outbreak of border disease in a sheep flock. *The Canadian Veterinary Journal*. 36(5): 307-309

- Carlsson, U. (1991). Border disease in sheep caused by transmission of virus from cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus. *Veterinary Record*. 128(7): 145–147.
- Carlton, McGavin, M.D. (1990). *Patologia Veterinária Especial de Thomson*. 2ª ed. ArtMed, Porto Alegre. 672p.
- Chappuis, G., Brun, A., Kato, F., Duffour, R., Durant, M. (1984). Isolement et caractérisation d'un pestivirus dans un foyer d'entérocólite leucopénie chez des moutons de l'Aveyron, *Epidémiol. Santé Anim.* 6: 117-118.
- Chase CC, Elmowalid G, Yousif AA. (2004). The immune response to bovine viral diarrhoea virus: A constantly changing picture. *Veterinary Clinics North America Food Animal Practice*. 20(1):95-114.
- Dahle, J., Liess, B., Frey, H.R. (1987). Transmission of pestiviruses between animal species: experimental infection of swine with the virus of bovine virus diarrhoea (BVD) and of cattle with the virus of European swine fever (ESP). *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* 94(10): 590– 594.
- Davis, R., Dvorak, G. & Peters, A. (2004) . Q Fever . *Query Fever Coxiellosis*. Acedido em 23 de Abril de 2012 em <http://www.sgh.org.sa/qf/files/Qfever.ppt#303,37,Acknowledgments>.
- Deregt D, Loewen K.G. (1995). Bovine viral diarrhoea virus: Biotypes and disease. *Canadian Veterinary Journal*. 36:371-378.
- Dubois, E., Russo, P., Prigent, M., Thiery, R. (2008). Genetic characterization of ovine pestiviruses isolated in France, between 1985 and 2006. *Veterinary Microbiology*. 130(1-2): 69-79.
- Ellis, W.A. (1994). Leptospirosis as cause of reproductive failure. *Veterinary Clinics of North America: Food and animal practice*. v.10, n.3, p.463-478.
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), Stockholm, Sweden. (2012). Secon report on the schmallenberg virus. *Eurosurveillance*. 17(14). Eurosurveillance editorial team.
- Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U. & Ball, L.A. (eds.) (2005). Pestivirus. In *Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of viruses*, VIIIth Report of the ICTV (Pp. 980-92). Amsterdam: Elsevier.

- Ferreira, A. Watter; Ávila, Sandra L.M. (1996). Diagnóstico Laboratorial. In Ferreira, A. Watter; Ávila, Sandra L.M., *Diagnostico laboratorial das doenças infecciosas e auto-imunes*. (2ªed) Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Fernández-Sirera, L., Mentaberre, G., López-Olvera, J.R., Cuenca, R., Lavín, S., Marco, I. (2010). Haematology and serum chemistry of Pyrenean chamois (*Rupicapra pyrenaica*) naturally infected with a border disease virus. *Research in Veterinary Science*. 90(3): 463-467.
- García-Pérez, A. L., Minguijoón, E., Barandika, J. F., Aduriz, G., Povedano, I., Juste R. A., Hurtado, A. (2009). Detection of Border disease virus in fetuses, stillbirths, and newborn lambs from natural and experimental infections. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 21(3): 331–337 .
- García-Pérez, A.L., Minguinjón, E., Estévez, L., Barandika, G., Aduriz, R.A., Juste, A., Hurtado, A. (2008). Clinical and laboratorial findings in pregnant ewes and their progeny infected with Border disease virus (BDV-4 genotype). *Research on veterinary science*. 86(2): 345-352 .
- Gardiner, A.C., Barlow, R.M. (1972) Experiments in Border disease. III. Some epidemiological considerations with reference to the experimental disease. *Journal comparative biology*. 82:29-35.
- Gates, N. (1994). A Practical Guide to Sheep Disease Management. Revised edition. Winchester, UK: News-Review Publishing Co.
- Giammarioli, M., La Rocca, S.A., Steinvach, F., Casciari, C., De Mia, G.M. (2011). Genetic and antigenic typing of border disease virus (BDV) isolates from Italy reveals the existence of a novel BDV group. *Veterinary Microbiology*. 147(3-4): 231-236.
- Gil, L. H. V. G., Ansari, I. H., Vassilev, V., Liang, D., Lai, V. C. H., Zhong, W., Hong, Z., Dubovi, E. J., Donis, R. O. (2006). The Amino-Terminal Domain of Bovine Viral Diarrhea Virus Npro Protein Is Necessary for Alpha/Beta Interferon Antagonism. *Journal of Virology*. 80(2): 900-911.
- Goyal, S.M., (2005) Diagnosis. In: Goyal, S.M., Ridpath, J.F., *Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis, Management and Control*. (1ª ed. Pp 197-208) Oxford, UK: Blackwell Publishing .
- Guedes, K., Riet-Correa, F., Dantas, A., Simões, S., Neto, E.G., Nobre, V., Medeiros, V. (2007). Doenças do sistema nervoso central em caprinos e ovinos no semi-árido. *Pesquisa veterinária brasileira*. V.27 n.1.

- Hornberg, A., Fernández, S.R., Vogl, C., Vilcek, S., Matt, M., Fink, M., Köfer, J., Schöpf, K. (2009). Genetic diversity of pestivirus isolates in cattle from Western Austria. *Veterinar. Microbiology*. 135(3-4): 205–213.
- Huck, R.A., Evans, D.H., Woods, D.G., King, A.A. and Stuart, P. (1975). Border disease of sheep. Comparison of the results of serological testing using complement fixation, immunodiffusion, neutralisation and immunofluorescent techniques. *British Veterinary Journal* 131: 427-435.
- Hussin, A. A., Woldehiwet, Z. (1994). Border disease virus: a review. *The Veterinary Bulletin* 64(12): 1131-1151.
- Hughes, L. E., Kershaw, G. F., Shaw, I. G. 1959. “B” or border disease. An undescribed disease of sheep, *Veterinary Record* 71: 313-316.
- Jeffrey, M., Roeder, P. L. (1987) Variable nature of border disease on a single farm: clinical and pathological description of affected sheep. *Research in Veterinary Science*. 43(1): 22-27.
- Kahn, C. M. (2005). Border Disease, congenital and inherited anomalies. In Kahn, C. M. & Line, S., *The Merck Veterinary Manual* (9º ed. pp. 452-454). New Jersey: Merial.
- Kirkland, P.D., MacKintosh, S.G., (2006). Ruminant Pestivirus Infections. In *Australia and New Zealand Standard Diagnostic Procedures, April 2006* .
- Krametter-Froetscher, R., Kohler, H., Benetka, V., Moestly, K., Golja, F., Vilcek, S., Baumgartner, W. (2007). Influence of communal alpine pasturing on the spread of pestiviruses among sheep and goats in Austria: first identification of border disease virus in Austria. *Zoonoses Public Health* 54(5): 209–213.
- Lemos, R.A.A., Nakazato, L. (2001). Polioencefalomalacia, p. 547-553. In: Riet-Correa, F., Schild, A.L., Mendez, M.C., Lemos, R.A.A. (ed.) *Doenças de Ruminantes e Equinos*. Vol.2. 2ª ed. Varela, São Paulo. 574p.
- Leyssen, P., De Clercq, E., Neyts, J. (2000). Perspectives for the Treatment of Infections with flavivirus. *Clinical Microbiology Reviews*. 13(1):67.
- Lima, E., Riet-Correa, F., Tabosa, I.M., Dantas, A.M., Medeiros, J.M., Sucupira Júnior, G. (2005). Polioencefalomalácia em caprinos e ovinos na região semi-árida do Nordeste do Brasil. *Pesquisa veterinária brasileira*. V.25 n.1.
- Loken, T., Bjerkås, I.B. (1982) Border disease in goats in Norway. *Research Veterinary Science*. 33:130-131.

- Loken, T., (2000). Border Disease in goats. International Veterinary Information Service (www.ivis.org). Acedido em 21 de Novembro de 2011 em http://www.ivis.org/advances/Disease_Tempesta/Loken/ivis.pdf.
- Mainar-Jaime, R.C., Vázquez-Boland, J.A. (1999). Associations of veterinary services and farmer characteristics with the prevalences of brucellosis and border disease in small ruminants in Spain. *Prev. Vet. Med.* 40, 193–205.
- Menzies, P.I. (2012). Vaccination programs for reproductive disorders of small ruminants. *Animal reproduction science*. 130(3-4): 162-172.
- Nassar, A.F.C. (2008). Listeriose nervosa em pequenos ruminantes. *Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal*. n.81.
- Nettleton, P.F., (2004). Border Disease. In Coetzer, J. A. W., Tustin, R. C., *Infectious Disease of Livestock volume 2*. (2ª ed. Pp. 970-974) Oxford University Press, UK.
- Nettleton, P. F. & Willoughby, K. (2008). Border Disease Virus. In Mahy, B. W. J., Van Regenmortel, M. H. V., *Encyclopedia of VIROLOGY*. (3ª ed. Pp:335-341) Elsevier, UK.
- Nettleton, P. F. & Willoughby, K. (2007). Border Disease. In Aitken, I. D., *Diseases of Sheep*. (4ª ed. Pp. 119-125) Blackwell Publishing, UK.
- Nettleton, P. F., Gilmour, J. S., Herring, J. A., Sinclair, J. A. (1992) The production and survival of lambs persistently infected with border disease virus. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases* 15(3): 179-188.
- Oguzoglu, T.C., Tan, M.T., Toplu, N., Demir, A.B., Bilge-Dagalp, S., Karaoglu, T., Ozkul, A., Alkan, F., Haas, L., Greiser-Wilke, I. (2009). Border disease virus (BDV) infections of small ruminants in Turkey: a new BDV subgroup. *Veterinary Microbiology*. 135(3-4): 374-379.
- Paton, D. J., Carlsson, U., Lowings, J. P., Sands, J. J., Vilcek, S. Alenius, S. (1995). Identification of herd-specific bovine viral diarrhoea virus isolates from infected cattle and sheep. *Veterinary Microbiology*, 43(4): 283-294.
- Pugh, D. G. (2008). *Border Disease*. In Pugh, D. G., *Sheep and Goat Medicine*. (2ª ed. Pp 389-391). Saunders, UK.
- Quinn, P. J., Markey, B. K., & Maguire, D. (2003). *Flaviviridae*. In Quinn, P. J., Markey, B. K., & Maguire, D., *Concise review veterinary microbiology*. (1ª ed. Pp 134). Blackwell Publishing, UK

- Radostits, O. M., Gay, C. C., Blood, D. & Hinchcliff, K. (2007). Border disease. In Radostits, O. M., Gay, C. C., Blood, D. & Hinchcliff, K., *Veterinary Medicine. A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. (10^a ed. Pp. 1414-1418). London: Saunders.
- Ridpath, J. F. (2005). Classification and Molecular Biology. In: Goyal, S. M, Ridpath, J. F. *Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis, Management and Control*. (1^a ed. Pp. 65-80) Blackwell Publishing, UK.
- Ridpath, J. F. & Bolin, S. R. (1997). Comparasion of the complete genomic sequence of the border disease virus, BD31, to other pestiviruses. *Virus research*. 50(2): 2992-2998.
- Roeder, P. L., Jeffrey, M., Drew, T. W. (1987). Variable nature of border disease on a single farm: the infection status of affected sheep. *Research in Veterinary Science* 43(1): 28-33.
- Russo, P., Dlisi, E., Nettleton, P.F. (1999) Border disease and abortion in small ruminants. *Mondial Vet. Proceedings of 26th World Veterinary Association, Lyon, France*.
- Sargison, N. (2008). The Lambing Percentage – Border Disease. In Sargison, N., *Sheep Flock Health a Planned Approach*. (1^a ed. Pp. 62-65). Blackwell Publishing, UK.
- Sawyer, M.M., Schore, C.E., Menzies, P.I. and Osburn, B.I. (1986). Border disease in a flock of sheep: epidemiologic, laboratory, and clinical findings. *Journal of American Veterinary Medical Association* 189: 61-65.
- Sawyer, M. M. (1992). Border disease of sheep: the disease in the newborn, adolescent and adult. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*.15(3): 171–177.
- Schweizer, M., Mätzener, P., Pfaffen, G., Stalder, H., Peterhans, E. (2006). "Self" and "Nonself" Manipulation of Interferon Defense during Persistent Infection: Bovine Viral Diarrhea Virus Resists Alpha/Beta Interferon without Blocking Antiviral Activity against Unrelated Viruses Replicating in Its Host Cells. *Journal of Virology*. 80(14): 6926-6935.
- Scott, J.L., Ketheesan, N., Summers, P.M. (2006): Leucocyte population changes in the reproductive tract of the ewe in response to insemination. *Reproduction, Fertility and Development*. 18, 627–634.

- Scott, P. R. (2007) Reproductive System Part 1: Female Reproductive System. In Scott, P. R., *Sheep Medicine* (1^aed. Pp. 67-68) Manson Publishing Ltd: London.
- Serkal, G., Ahmet, A., Osman, Ç. (2010). Comparison of hematological and biochemical parameters in sheep naturally and persistently infected with a border disease virus. *Tropical Animal Health and Production*. 43(3): 553-556.
- Silva, A.V., Cutolo, A.A., Langoni, H. (2002). Comparação da reação de imunofluorescência indireta e do método de aglutinação direta na detecção de anticorpos anti-toxoplasma em soros ovinos, caprinos, e felinos. *Arquivos do Instituto Biológico*. v.69, n.1, p.7 – 11.
- Smith, B. P., (2009). Disease of the Nervous System – Border Disease. In Smith, B.P., *Large Animal Internal Medicine*. (4^aed. Pp. 977-978) Mosby, EUA.
- Smith, M.C., Sherman, D.M. (2009). Border Disease. In Smith, M.C., Sherman, D.M., *Goat Medicine*. (2^aed. Pp 593) Wiley-Blackwell, EUA.
- Stalder, H.P., Meier, P., Pfaffen, G., Wageck-Canal, C., Rüfenacht, J., Schaller, P., Bachofen, C., Marti, S., Vogt, H.R., Peterhans, E. (2005). Genetic heterogeneity of pestiviruses of ruminants in Switzerland. *Preventive Veterinary Medicine*. 72(1-2): 37–41.
- Strong, R., La Rocca, S.A., Ibata, G., Sandvik, T. (2010). Antigenic and genetic characterisation of border disease viruses isolated from UK cattle. *Veterinary Microbiology*. 141(3-4): 208–215.
- Sullivan, D.G., Chang, G.J., Akkina, R.K. (1997). Genetic characterization of ruminant pestiviruses: sequence analysis of viral genotypes isolated from sheep. *Virus Research*. 47(1): 19–29.
- Syva laboratories. (2005). Imagem obtida em www.midiathecavipec.com/porcicultura/porci080206.htm, acessado a 23 de Outubro de 2011.
- Tenter, A.M., Heckeroth, A.R., Weiss, L.M. (2000) *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. International. *Journal for Parasitology, Brisbane*. n.12/13, v.30, p.1217-1258.
- Thabti, F., Fronzarolli, L., Dlissi, E., Guibert, J-M., Hammami, S., Pepin, M., Russo, P. (2002). Experimental model of Border Disease Virus infection in lambs: comparative pathogenicity of pestiviruses isolated in France and Tunisia. *Veterinary research* 33(1): 35-45.

- Toma, B., Dufour, B., Sanaa, M., Benet, J-J., Shaw, A., Moutou, F., *et al.* (2004). *Epidemiologia aplicada: à luta colectiva contra as principais doenças animais transmissíveis*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.
- Underwood, E.J., Suttle, N.F. The mineral nutrition of livestock. 3.ed. New York: CAB International, 1999. 614p.
- Valdazo-Gonzalez, B., Alvarez-Martinez, M., Sandvik, T. (2007). Genetic and antigenic typing of border disease virus isolates in sheep from the Iberian Peninsula. *Veterinary Journal*. 174(2): 316–324.
- Van den Brom, R., Luttikholt, S.J., Lievaart-Peterson, K., Peperkamp, N.H., Mars, M.H., Van der Poel, W.H., Vellema, P. (2012). Epizootic of ovine congenital malformations associated with Schmallenberg virus infection. *Tijdschr Diergeneeskd*. 137(2):106-11.
- Vantsis, J.T., Rennie, J.C., Gardiner A.C., Wells, P.W., Barlow, R.M., Martin W.B. (1980). Immunization against border disease. *Journal of Comparative Pathology*. 90(3):349-354.
- Veterinary Laboratories agency's. (2009). Veterinary Laboratories agency's disease surveillance report for England and Wales for April. *Veterinary Record* ;164:799-802.
- Vilcek, S., Nettleton, P.F. (2006). Pestiviruses in wild animals. *Veterinary Microbiology*, 116(1-3): 1 – 12.
- Vilcek, S., Herring, J.A., Nettleton, P.F., Lowings, J.P., Paton, D.J. (1994). Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Archives of virology*. 136(3-4): 309–323.
- Vilcek, S., Nettleton, P.F., Paton, D.J., Belak, S. (1997). Molecular characterization of ovine pestiviruses. *Journal of General Virology*. 78(4): 725–735.
- Vilcek, S., Björklund, H.V., Horner, G.W., Meers, J., Belák, S. (1998). Genetic typing of pestiviruses from New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal* 46(1): 35–37.
- Wensvoort, G., Terpstra, C. (1988). Natural infections of pigs with bovine viral diarrhoea virus associated with signs resembling swine fever. *Research in Veterinary Science*. 45(2): 137 -142.
- Willoughby, K., Valdazo-González, B., Maley, M., Gilray, J., Nettleton, P.F., (2006). Development of a real time RT-PCR to detect and type ovine pestiviruses. *Journal of Virological Methods*. 132(1-2): 187–194.

- Wong, D. Virological tests 2003. Acedido a 20 de Novembro de 2011 em <http://virology-online.com/general/Test1.htm>.
- World Organisation for Animal Health. (2004). Border Disease. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, 2.7.1. Acedido a 14 de Novembro de 2011 em <http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A-00049.htm>.

7. Anexos

Anexo I

Exemplo de Relatório de

Análises Laboratoriais

Efectuadas



BOLETIM ANALÍTICO

DEPARTAMENTO DE SOROLOGIA	
Nº Registo: S-39/11 Nº Análise: Data de Entrada: 27/04/11 Data de Início: 27/04/11 Data de Conclusão: 20/05/11 Data de Saída: 24/05/11	Amostra: sangue Espécie: ovino Idade: Nº de Amostras: 204
CLIENTE A FACTURAR:	
Nome: Miguel Parreira Morada: Código Postal: Telefone: Fax: Telemóvel:	Nº de Contribuinte:
EXPLORAÇÃO/PROPRIETÁRIO:	
Nome: Nº de Contribuinte: Morada: Código Postal: Telefone: Fax: Telemóvel:	
OBSERVAÇÕES:	
Dra Ângela Dâmaso	
ENTREGUE POR:	
MÉDICO VETERINÁRIO: DR MIGUEL PARREIRA (MIGUEL.PARREIRA@HOTMAIL.COM)	

Junto enviamos resultados da pesquisa de:

MÉTODO ELISA					
Análise	Qt	Análise	Qt	Análise	Qt
Reovirus aviário (Civtest)		IBR gB (Ingenasa)		Aujeszky gE (Civtest)	
Gumboro (Civtest)		IBR gE (IDEXX)		Parvovirus (Ingenasa)	
Newcastle (Civtest)		IBR gB (IDEXX)		APP (Civtest)	
Bronquite infecciosa (Civtest)		BVD Ag (IDEXX)		PRRS (IDEXX)	
TRT (Rinotraqueíte) (Civtest)		BVD Ac (Ingenasa)		Myc. hyopneumoniae (IDEXX)	
EDS (queda de postura) (Civtest)		BRSV (Civtest)		Influenza (Civtest)	
ILT (Laringotraqueíte Infecciosa) (Civtest)		Neospora (Civtest)		Mal Rubro (Civtest)	
Influenza aviária (Civtest)		Myc. paratuberculosis (POURQUIER)		Ileite (Bioscreen)	
ORT (Ornitobacterium) *		Febre Q (IDEXX)		Leptospira *	
APV (Pneumovirus)		Clamidia (Civtest)		Circovirus (Ingenasa)	
		Parainfluenza (PI3) (POURQUIER)			
		Leptospira hardjo (Prionics)		Haemophilus parasuis (Ingenasa)	
		BDV (Svanova)	204		

* Análise subcontratada

A responsável

Isabel Silva

LMV.183.00

L.M.V. – Laboratório de Medicina Veterinária, Lda.
Lugar da Sornateira, Alalaia - 2005-110 Almoester Santarém
Telf.: 243 491 797 /8/9; Fax.: 243 491 277; e-mail: sorologia@lmv.com.pt
NIF.: 502 646 551

NIF.: 502 646 551
Telf.: 243 491 797 /8/9; Fax.: 243 491 277; e-mail: sorologia@lmv.com.pt
Lugar da Sornateira, Alalaia - 2005-110 Almoester Santarém
L.M.V. – Laboratório de Medicina Veterinária, Lda.

LMV.183.00



BOLETIM ANALÍTICO

Nº ordem da Amostra	Identificação da Amostra	D.O.	Resultado ELISA BDV
CN		0,042	
CP		1,172	
1	1	-0,163	Negativo
2	1	-0,345	Negativo
3	1	0,016	Negativo
4	1	-0,174	Negativo
5	1	-0,196	Negativo
6	2	0,010	Negativo
7	2	0,172	Negativo
8	2	0,074	Negativo
9	2	0,010	Negativo
10	2	0,012	Negativo
11	3	0,000	Negativo
12	3	0,055	Negativo
13	3	0,002	Negativo
14	3	-0,002	Negativo
15	3	0,017	Negativo
16	4	-0,133	Negativo
17	4	-0,343	Negativo
18	4	-0,302	Negativo
19	4	-0,156	Negativo
20	4	-0,423	Negativo
21	4	-0,361	Negativo
22	4	0,180	Negativo
23	4	-0,343	Negativo
24	4	-0,017	Negativo
25	4	-0,250	Negativo
26	5	-0,036	Negativo
27	5	-0,045	Negativo
28	5	-0,004	Negativo
29	5	0,069	Negativo
30	5	0,023	Negativo
31	6	-1,028	Negativo
32	6	-0,659	Negativo
33	6	-0,388	Negativo
34	6	-0,550	Negativo
35	6	-1,051	Negativo
36	7	1,359	Positivo
37	7	-0,365	Negativo
38	7	-0,426	Negativo
39	7	-0,333	Negativo
40	7	0,110	Negativo
41	7	-0,340	Negativo
42	7	-0,270	Negativo
43	7	-0,477	Negativo
44	7	0,124	Negativo

Nº ordem da Amostra	Identificação da Amostra	D.O.	Resultado ELISA BDV
CN		-0,006	
CP		1,053	
45	8	1,603	Positivo
46	8	1,242	Positivo
47	8	0,518	Positivo
48	8	0,770	Positivo
49	8	-0,261	Negativo
50	9	-0,061	Negativo
51	9	-0,040	Negativo
52	9	-0,228	Negativo
53	9	-0,059	Negativo
54	9	0,034	Negativo
55	9	-0,062	Negativo
56	9	-0,305	Negativo
57	9	-0,072	Negativo
58	9	0,040	Negativo
59	9	0,012	Negativo
60	A	-0,013	Negativo
61	A	0,001	Negativo
62	A	-0,008	Negativo
63	A	-0,024	Negativo
64	A	-0,030	Negativo
65	12	-0,143	Negativo
66	12	-0,034	Negativo
67	12	-0,214	Negativo
68	12	-0,057	Negativo
69	12	-0,218	Negativo
70	13	-0,262	Negativo
71	13	-0,087	Negativo
72	13	-0,114	Negativo
73	13	-0,079	Negativo
74	13	-0,249	Negativo
75	14	-0,283	Negativo
76	14	-0,271	Negativo
77	14	-0,263	Negativo
78	14	-0,112	Negativo
79	14	0,180	Negativo
80	10	-0,027	Negativo
81	10	0,004	Negativo
82	10	0,478	Positivo
83	10	-0,119	Negativo
84	10	-0,262	Negativo
85	10	0,006	Negativo
86	10	0,014	Negativo
87	10	-0,451	Negativo
88	10	-0,216	Negativo

Interpretação resultados

Se OD > 0,25 → Positivo

Se OD < 0,25 → Negativo

LMV.183.00

L.M.V. – Laboratório de Medicina Veterinária, Lda.
 Lugar da Sorrateira, Atalaia - 2005-110 Almoester Santarém
 Telf.: 243 491 797 / 8/9; Fax.: 243 491 277; e-mail: sorologia@lmv.com.pt
 NIF.: 502 646 551

LMV.183.00
 Telf.: 243 491 797 / 8/9; Fax.: 243 491 277; e-mail: sorologia@lmv.com.pt
 Lugar da Sorrateira, Atalaia - 2005-110 Almoester Santarém
 L.M.V. – Laboratório de Medicina Veterinária, Lda.

LMV.183.00