



Relatório Final de Estágio  
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**HEMOPARASITOSE EM BOVINOS NA REGIÃO DE  
PORTALEGRE**

Ana Paula Maia Magalhães

Orientador(es)

**Gertrude Averil Baker Thompson**

Co-Orientador(es)

**Lina Luís Salgueiro Costa**

Porto 2012

**U. PORTO**



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR  
UNIVERSIDADE DO PORTO

Relatório Final de Estágio  
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**HEMOPARASITÓSES EM BOVINOS NA REGIÃO DE  
PORTALEGRE**

Ana Paula Maia Magalhães

Orientador(es)

**Gertrude Averil Baker Thompson**

Co-Orientador(es)

**Lina Luís Salgueiro Costa**

Porto 2012

## Resumo

Durante o período do estágio curricular foi possível constatar que a “Febre da Carraça”, nome comum para um conjunto de sintomas provocados pela presença de hemoparasitas, como *Anaplasma spp.*, *Babesia spp.* e *Theileria spp.*, transmitidos aos bovinos pela picada de carraças era uma realidade comum na Região de Portalegre. Dada a sua importância, esse foi o tema escolhido para esta dissertação. Os objetivos do trabalho foram melhor conhecer os fatores de risco para a infeção dos animais, encontrar formas de controlo e tratamento adequadas e estimar a prevalência e incidência de hemoparasitoses em bovinos nesta região. Para tal foram colhidas amostras de sangue a 144 animais saudáveis, escolhidos aleatoriamente, num total de 19 explorações para realização de exames diretos. Os animais foram considerados positivos ao exame microscópico se fosse visível um parasita dos géneros *Anaplasma*, *Babesia* e *Theileria*. Das 19 explorações, 5 com história ou suspeita de theileriose foram incluídas num estudo dinamizado pelo Dr. Jacinto Gomes, em que as amostras de sangue foram também submetidas a teste de PCR (do inglês *Polymerase Chain Reaction*) para a deteção de *Theileria annulata*. Foi construída uma tabela com o registo dos sintomas de animais doentes, resultados dos testes de diagnóstico direto, tratamentos e evolução.

Foi obtida uma prevalência de 69%, comprovando que a região de Portalegre é endémica. Todos os géneros de parasitas que foram pesquisados foram identificados, sendo o mais prevalente o género *Babesia* (63%), o segundo *Anaplasma marginale* (43%) e o género *Theileria* o menos encontrado (36%). A análise por PCR, confirmou a presença de *Theileria annulata* em duas amostras únicas processadas por este método. A incidência de hemoparasitoses encontrada foi de 1%, o que parece não corresponder à realidade verificada.

A região de Portalegre apresenta fatores de risco à presença e disseminação de hemoparasitas, e este trabalho pode ser uma contribuição importante para a sensibilização dos produtores e médicos veterinários para o desenho de melhores formas de controlo e de prevenção da doença.

## **Agradecimentos**

Durantes oito meses de estágio tive a oportunidade de aumentar o meu conhecimento e a minha prática na área da Medicina Veterinária, e vivenciar boas experiências numa terra que não conhecia, tudo com a companhia e apoio de algumas pessoas que não podia deixar de agradecer.

À Dra. Lina Costa, minha co-orientadora, agradeço por ter aceite a minha proposta de estágio, pelo acolhimento e integração, pelas respostas pacientes e claras às muitas dúvidas, pelo incentivo a fazer sempre mais e melhor e pelo exemplo de boa profissional que é.

Ao Dr. Luís Bonacho pelos conselhos cheios de sabedoria, devido à grande prática como Médico Veterinário de campo, de clínica e da vida.

À Carla Luz, recepcionista da clínica, pelo companheirismo, brincadeiras, boa disposição e por me fazer sentir em casa.

À enfermeira Helena Curinha, pelas longas manhãs passadas juntas no internamento, pela sua sinceridade e disponibilidade para me ensinar aquilo que na prática nos surge e não vem nos livros da faculdade.

Ao enfermeiro Ricardo Oliveira, pelas muitas hora de trabalho no campo, pela paciência para explicar as milhares de coisas e, pela troca de conhecimentos, por todas as palavras amigas e de incentivo.

Ao enfermeiro Hélio Correia, pelas conversas que traziam à lembrança o Norte e a minha casa, e faziam com que a saudade fosse mais pequena.

À Dona Vitória, por nos contagiar com a sua alegria e boa disposição nas primeiras horas dos dias de trabalho.

À Dona Ana, pela sua simpatia constante e acolhimento.

A todo os profissionais da Clilegre, obrigado pelo vosso profissionalismo e competência!

À professora Gertrude Thompson, minha orientadora, que apesar da sua limitação de tempo, teve sempre uma palavra crítica e exigente relativamente ao meu estágio e pelo seu apoio prestado.

Ao Dr. Jacinto Gomes por me ter dado a oportunidade de contactar com o trabalho de laboratório e pela troca de experiências em relação ao tema escolhido para o relatório. A ele e ao pessoal do Laboratório de Parasitologia do Laboratório Nacional de Investigação Veterinária (LNIV), obrigado pela simpatia e paciência demonstradas nos dias em que lá estive.

Aos meus primos Gina e Zé, que me acolheram estes meses em sua casa como uma filha, que sempre me apoiaram e que me deram a conhecer o melhor do Alentejo. Está combinado o grande jantar para breve!

Aos meus pais que sempre deram o seu melhor para eu poder estudar, à minha irmã por ser a minha melhor amiga, e aos meus restantes familiares que sempre demonstraram o seu grande orgulho e confiança em mim. Não seria quem sou sem vocês!

Aos amigos, pelos últimos seis anos memoráveis, pelo vosso entusiasmo em ouvirem as minhas aventuras no estágio, as alegrias e dissabores, e pelas palavras sempre certas na hora certa.

A todos vós, o meu muito obrigado!

# Índice

Resumo .....	iii
Agradecimentos .....	iv
1. Introdução.....	1
2. Descrição da região do Alto Alentejo .....	2
3. Vetores .....	5
4. Hemoparasitoses em Bovinos.....	6
4.1 Anaplasmosose.....	6
a) Caracterização .....	6
b) Epidemiologia.....	7
c) Sintomatologia .....	7
d) Diagnóstico.....	8
4.2 Babesiose.....	9
a) Caracterização .....	9
b) Epidemiologia.....	10
c) Sintomatologia .....	12
d) Diagnóstico.....	12
4.2 Theileriose.....	13
a) Caracterização .....	13
b) Epidemiologia.....	14
c) Sintomatologia .....	15
d) Diagnóstico.....	15
5. Tratamento e prevenção das hemoparasitoses em bovinos.....	17
6. Trabalho desenvolvido .....	22
6.1 Introdução .....	22
6.2 Métodos e meios .....	23
6.3 Resultados .....	25
6.4 Discussão.....	26
7. Conclusões finais.....	27
8. Bibliografia .....	28
9. Anexos.....	31

# 1. Introdução

No âmbito do estágio curricular de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, realizado durante o período de setembro de 2011 a abril de 2012, foi possível acompanhar e integrar os trabalhos do Hospital Veterinário de Portalegre – CLILEGRE, nas áreas de Sanidade Animal e Medicina e Clínica de Pequenos Animais. Por interesse pessoal, a primeira área foi a eleita para o desenvolvimento do relatório final de estágio.

Durante este período, foram desenvolvidas diversas atividades na área clínica de pequenos animais, como a participação em consultas, tratamento de animais hospitalizados, acompanhamento dos casos clínicos e participação em cirurgias. Em relação à clínica de animais de espécies pecuária, foram realizadas atividades inerentes à sanidade de efetivos animais nos pequenos ruminantes, como identificação animal, rastreios de Brucelose, desparasitações e vacinações contra septicemia e Febre Catarral Ovina, ou Língua Azul, no caso dos ovinos; e em grandes ruminantes, as provas de intradermatuberculização, rastreios de Brucelose e Leucose Enzoótica Bovina, desparasitações e vacinações para *Clostridium spp.*, Vírus da Rinotraqueíte Bovina (IBR, do Inglês *Infectious Bovine Rhinotracheitis*) e Vírus da Diarreia Bovina (BVD, do inglês *Bovine Virus Diarrhea*). Foi possível também acompanhar outros casos de prática de clínica de grandes animais como cirurgias, cesarianas e correções de prolapsos vaginais e uterinos, tratamento de casos clínicos como “Febre da Carraça”, diarreias em bezerros, queratoconjuntivite infecciosa bovina, etc, e participar em alguns estudos: de prevalência, nomeadamente de IBR e BVD, dinamizado pela Companhia Farmacêutica *Pfizer*, e de Linfadenite Caseosa em pequenos ruminantes; e num estudo sobre a diversidade genética na espécie de *Theileria annulata*, dinamizado por Dr. Jacinto Gomes, veterinário responsável pelo Laboratório de Parasitologia do LNIV em Lisboa com a cedência de algumas amostras de sangue de bovinos. No seguimento deste estudo, foi possível durante dois dias trabalhar no laboratório de Parasitologia do LNIV com os seus profissionais e contactar com procedimentos, como a técnica de PCR concebida e descrita no âmbito do trabalho de mestrado em Genética Molecular e Biomedicina do Mestre Mário Santos, e a técnica de PCR em tempo real.

Durante os primeiros meses de estágio foi possível constatar que uma grande percentagem das queixas dos produtores de animais de espécies pecuárias coincidia com animais “caídos”, que “não comiam” e com as “mucosas pálidas”. Esses animais normalmente estavam febris e com “chumbeiras” presentes na pele (carraças pequenas que se sentiam á passagem da mão pelo pêlo). Em casos em que o

tratamento não era rapidamente instaurado, os animais acabavam por morrer. O diagnóstico definitivo era obtido após a observação de esfregaços sanguíneos e a visualização de hemoparasitas. As espécies de hemoparasitas mais prevalentes foram *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* e *bigemina* e, em alguns casos, *Theileria annulata*.

A “Febre da Carraça” é o nome comum para um conjunto de sintomas provocados pela presença de hemoparasitas, transmitidos aos bovinos pela picada de carraças. É uma doença distribuída mundialmente, difícil de controlar e que provoca grandes prejuízos económicos em diversos países, para além de, em algumas situações, ser um risco para a saúde humana (o caso da *Babesia divergens*). Em 1984 a *Food and Agriculture Organization* (FAO) estimou um gasto mundial anual de 7000 milhões de dólares devido a hemoparasitoses, estando incluído nesse montante as perdas diretas em mortes de animais e produtividade, assim como os custos de medidas de controlo.

Esta patologia é uma realidade comum e preocupante na população de bovinos da área de atuação da CLILEGRE, sendo a sua prevalência e incidência desconhecida. Para o combate desta doença e diminuição do impacto económico negativo nas explorações, e é urgente a implementação de novas e eficazes formas de controlo. Dada a sua óbvia importância, o tema escolhido para esta dissertação foi a de hemoparasitoses em bovinos na região de Portalegre. Os objetivos específicos desta dissertação são:

1. Estimar a prevalência e incidência de hemoparasitoses na população de animais da região de Portalegre
2. Identificar fatores de risco associados à infeção dos animais
3. Propor formas de controlo e tratamento adequadas á população em causa

## **2. Descrição da região do Alto Alentejo**

Alto Alentejo é uma sub-região portuguesa, pertencente à região do Alentejo e correspondente ao distrito de Portalegre, que possui quinze concelhos, sendo a própria cidade de Portalegre, Nisa, Marvão, Castelo de Vide, Monforte e Crato áreas de acção da CLILEGRE (Wikipedia, 2011).

Esta sub-região tem uma área total de 519 082 hectares, que corresponde a 7% do território nacional e 17% da área total do Alentejo. Possui no total 9 mil explorações, e 15% destas têm uma área igual ou superior a 50 hectares. A superfície agrícola utilizada (SAU) por exploração no Alto Alentejo é de 48 hectares (INE, 2009).

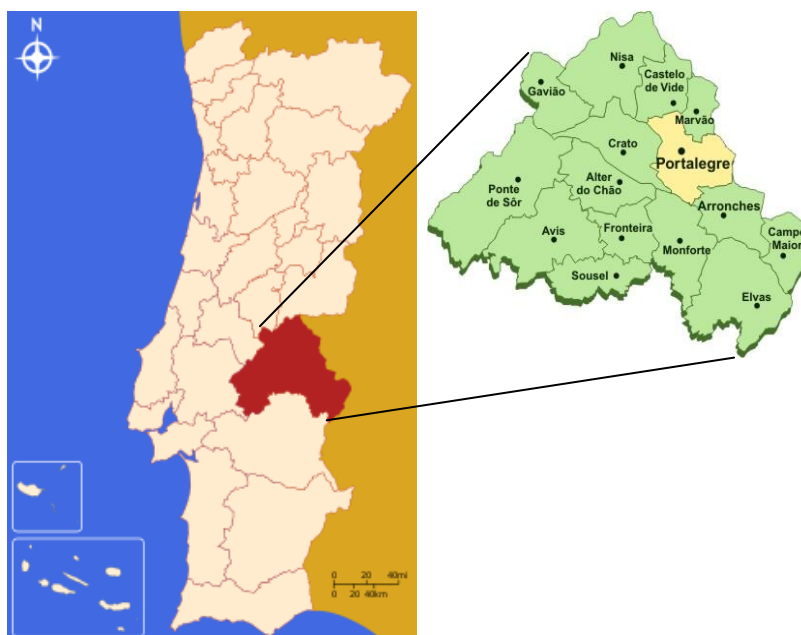


Figura 1: Localização geográfica do Alto Alentejo e seus concelhos. (Mapa adaptado de <http://pt.wikipedia.org> e <http://www.portalegredigital.biz/pt>)

O Alto Alentejo tem um clima mediterrânico, ou seja, é caracterizado por um verão quente e seco e um inverno instável e húmido. Segundo o Instituto de Meteorologia, entre os anos 1971-2000 as maior e menor temperaturas registadas em Portalegre foram 40,4°C (Julho) e -4,5°C (Janeiro). Os meses mais húmidos correspondem aos meses de Inverno, sendo Dezembro o mês com maior média de precipitação (136mm; 67,5mm de máxima diária registada). O mês mais seco é Julho, com um total médio de 7,5mm. No entanto, ao longo dos anos, o clima tem vindo a sofrer algumas alterações. Durante o período de setembro de 2011 a abril de 2012 as temperaturas em Portalegre foram ligeiramente maiores e os meses mais secos, em comparação com as normais climatéricas de 1971-2000. A pluviosidade média do mês de Dezembro de 2011 foi de 25mm, menos 111 mm comparando com a média dos outros anos. A sazonalidade típica está a mudar, interferindo também com os períodos de maior desenvolvimento de carraças, que ocorre com temperaturas amenas e pouca pluviosidade (Instituto Nacional Meteorologia, 2011).

O Alto Alentejo é uma região com uma grande diversidade de paisagens. A norte de Portalegre predominam os montados tipicamente alentejanos, com zonas secas e planas, alternando com colinas na maior parte dos casos relativamente baixas, onde os sobreiros e azinheiras são a flora predominante. Em contraste encontra-se o Parque Natural da Serra de S. Mamede, caracterizado por ser montanhoso e húmido, com uma flora e fauna muito diversificada, em que é possível encontrar desde carvalhais, soutos, montados de sobro alternando com olivais, pinhais e eucaliptais (Wikipedia, 2011).

O concelho de Portalegre tem como atividades económicas de considerável importância a empresa têxtil, a corticeira, a silvicultura, a exploração das espécies cinegéticas, da agro-pecuária, pastorícia e produtos derivados. Segundo o anuário estatístico da região Alentejo de 2009 do Instituto Nacional de Estatística (INE), as principais culturas no Alentejo são os cereais (destacando a produção anual de 300 mil toneladas de milho, que é metade da produção nacional, trigo e aveia), laranjas, azeitonas e uvas de mesa, tomate para indústria, arroz e girassol (INE, 2009).

Em relação às espécies de interesse pecuário, é no Alentejo que se concentra a maioria dos efectivos de animais de espécies bovina, suína e ovina. Em 2009 existiam 515 mil bovinos nesta região (correspondente a 46% do efectivo nacional), sendo 86% animais de aptidão de carne; 851 mil suínos (44% do efectivo nacional) e 1 milhão e 150 mil ovinos (52% do efectivo nacional). Apesar da produção de bovinos de carne assumir uma grande importância nesta região, a carne proveniente de ovinos e caprinos (principalmente borrego e cabrito) são as que têm um maior peso na economia nacional. 39% de borregos e 29% de caprinos abatidos e aprovados para consumo, no ano de 2009, eram provenientes do Alentejo (INE, 2009).

Nesta região encontram-se bovinos de aptidão de carne de raças autóctones, como a Alentejana e Mertolenga, e de raças exóticas, como Limousin e Charolês, mas as mais comuns são os cruzados (normalmente entre Alentejana e Charolês) (Fig.3). Sendo o Alto Alentejo uma zona onde predomina a grande propriedade, é de prever que o sistema de produção de bovinos, seja por excelência o extensivo. Os animais raramente estão estabulados, alimentando-se em pastagens naturais e de algumas forragens semeadas destinadas ao pastoreio direto, e suplementados em alturas de maior escassez alimentar.



Figura 2: Bovinos da raça Mertolenga (A) em extensivo e grupo de animais cruzados (B). (Fotos tiradas durante estágio)

### 3. Vetores

Os vetores da “Febre da Carraça” são, como o próprio nome indica, as carraças. Estes parasitas pertencem ao Filo *Arthropoda*, constituída por invertebrados e à Classe *Arachnida*, com adultos com quatro patas, peças bucais extensamente modificadas e sem antenas.

Em Portugal existem doze diferentes espécies de carraças que afetam bovinos, e pertencem às duas famílias de carraças: *Ixodidae* e *Argasidae*, e a seis géneros diferentes: *Ixodes*, *Rhipicephalus*, *Hyalomma*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis* e *Ornithodoros* (Caeiro 1999). Os ixodídeos são os vetores mais comuns, têm um rígido escudo quitinoso que cobre toda a superfície dorsal do macho adulto enquanto a fêmea adulta, larva e ninfa têm um escudo mais pequeno. As carraças passam por períodos curtos nos hospedeiros para se alimentarem, sendo classificadas como carraças de um, dois, ou três hospedeiros, dependendo do número de hospedeiros que necessitam de se alimentar para completar seu ciclo evolutivo, desde larva, a ninfa e adulto (Urquhart 1998).

A sua distribuição depende essencialmente de fatores ambientais, como o clima e vegetação. São mais propícios em climas temperados e secos e em regiões de pastagem natural, onde espécies *Quercus* (carvalho, sobreiro, azinheira, etc) são a principal vegetação. (Caeiro 1999).

Existe aproximadamente 20 espécies de carraças, a nível mundial capazes de transmitir *A. marginale* (Kocan *et al.* 2010). Em Portugal conhece-se *Rhipicephalus annulatus*, uma carraça de três hospedeiros. Este mesmo vetor é capaz de transmitir *Babesias*.

*Rhipicephalus bursa* e *Ixodes ricinus*, presentes em Portugal, podem transmitir *B. bigemina*, *B. bovis* e *B. divergens*.

*Hyaloma spp* são os principais vetores de transmissão de *T. annulata*, no entanto, está descrito que *I. ricinus* é capaz de também transmitir esse parasita.

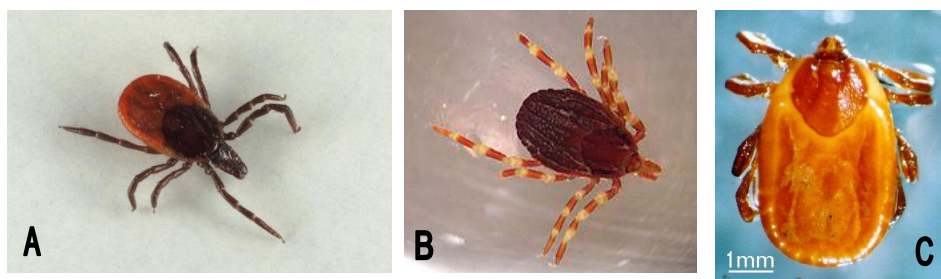


Figura 3: Principais vetores de hemoparasitoses. A: *Ixodes ricinus*; B: *Hyalomma marginatum* C: *Rhipicephalus burs*. (Fonte: www.google.com)

Como é possível verificar, uma única espécie de carraça pode transmitir diferentes parasitas, e sendo Portugal um país com um clima e vegetação favoráveis ao desenvolvimento destes vetores, uma forma de atuar contra a “Febre da Carraça” é atuar nos mesmos vetores.

## 4. Hemoparasitoses em bovinos

### 4.1. Anaplasmosose

#### a) Caracterização

A anaplasmosose, uma doença caracterizada por febre, anemia e icterícia, é causada por espécies do género *Anaplasma*. A infeção é transmitida por carraças ou mecanicamente por insetos picadores ou contaminação sanguínea por fómites, sendo a forma biológica a mais relevante.

O género *Anaplasma* foi descrito pela primeira vez por Arnold Theiler, em 1910, como uns “pontos marginais” visíveis em eritrócitos de bovinos com anemia. Determinou que estes protozoários eram diferentes dos que provocavam a febre de Texas, descrita anteriormente por Smith e Kilborne, em 1893, e que babesiose e anaplasmosose eram doenças diferentes mas podiam co-existir nos mesmos animais.

Em 2001 existiu uma revisão e reclassificação dos organismos da ordem. Os organismos do grupo *Anaplasma* pertencem à ordem *Rickettsiales* e família *Anaplasmataceae* (Kocan *et al.* 2010). São parasitas intra celulares obrigatórios e que se encontram exclusivamente dentro de vacúolos no citoplasma de eritrócitos. Multiplicam-se em células de animais vertebrados e invertebrados.

São três as espécies do grupo *Anaplasma* que infetam ruminantes: *A. marginale*, *A. centrale* e *A. ovis*. *A. marginale* e *A. centrale* afetam bovinos, sendo a segunda a menos patogénica e usada na produção de vacinas vivas em países como Israel e Austrália. *A. ovis* é um parasita de ovinos.

Estes organismos, uma vez no sangue dos hospedeiros definitivos, parasitam os eritrócitos, invaginando a membrana celular e formam um vacúolo. A partir daí, dividem-se por fissão binária, formando um corpúsculo de inclusão com quatro ou até oito “corpúsculos iniciais”, assim designados. Numa infeção aguda, 70% ou mais dos eritrócitos podem estar parasitados. O período de incubação varia com a dose infetiva mas é em média 28 dias (Kocan *et al.* 2010). Após deteção da infeção, o número de eritrócitos parasitados aumenta exponencialmente.

Animais que sobrevivem a infeção aguda desenvolvem infeções persistentes caracterizadas por um nível baixo de parasitémia. Estes animais ficam

imunocompetentes e não manifestam sinais clínicos a uma outra exposição (Kocan *et al.* 2010).

### **b) Epidemiologia**

Anaplasmoses é endêmica em países tropicais e sub-tropicais (Kocan *et al.*, 2010) e em vários estados dos EUA, no México, América Central e do Sul, Caraíbas e em todos os países da América Latina, com exceção das áreas desertas e certas cordilheiras. Na Europa, esta espécie é encontrada principalmente nos países mediterrânicos. É também endêmica em regiões da África e Ásia.

Atualmente muitas sub-espécies de *A. marginale* estão a ser identificadas mundialmente, e variam entre si no genótipo, antígenos, morfologia e infetividade das carraças. Estas diferenças podem ser visíveis dentro de países e nas próprias explorações. Esta situação pode ser possível devido ao grande movimento de animais entre regiões e países.

Acredita-se que a distribuição de anaplasmoses continuará a mudar devido ao aquecimento global, que influencia o movimento de vetores e ao movimento animal. Por outro lado, a anaplasmoses ocorre frequentemente em bovinos, mas outros ruminantes selvagens, como o búfalo, bisonte, veados, alces etc, podem ser infetados e tornarem-se reservatórios da *rickettsia* (Kocan *et al.* 2010).

### **c) Sintomatologia**

Os sinais são normalmente mais discretos em bovinos com menos de um ano de idade que não tiveram contacto prévio com *Anaplasma*. A partir dessa idade, os animais começam a ser mais suscetíveis e desenvolvem a anaplasmoses típica, e se não tratada, pode mesmo ser fatal (Kocan *et al.* 2010).

Pirexia é normalmente o primeiro sinal da doença e pode ocorrer quando a infeção é ainda de 1%. Temperaturas excessivas de 40°C normalmente persistem durante o período de aumento de parasitemia. A severidade da doença está associada ao grau de anemia. As células infetadas são fagocitadas pelas células reticuloendoteliais resultando numa anemia moderada a grave e icterícia (numa fase já tardia da doença), sem hemoglobulinemia ou hemoglobinúria. Os animais ficam fracos e letárgicos, deixam de comer, têm dificuldades respiratórias e vacas gestantes podem abortar. Com o avançar da doença os animais podem desenvolver sintomatologia gastro intestinal como atonia ruminal e constipação associadas a desidratação e perda de peso, ou défices neurológicos, devido a anoxia cerebral.

A recuperação espontânea é mais comum em animais jovens. Em animais adultos e sob stress as taxas de mortalidade rondam os 50-60% (Kocan *et al.* 2010).

#### d) Diagnóstico

O diagnóstico é baseado na conjugação da história, sintomatologia clínica e exames complementares como esfregaços sanguíneos, testes serológicos e moleculares.

Na história deve-se valorizar fatores como a zona geográfica onde se encontram os animais, o historial da exploração em relação a hemoparasitoses, a introdução de novos animais, o clima, o tratamento dos terrenos, o plano vacinal e desparasitação da vacada.

Animais que deixaram de comer, com febre e anemia visível são candidatos fortes para se realizar um esfregaço sanguíneo.

O exame microscópico é normalmente o teste mais usado na prática clínica, por ser económico e simples de realizar. Uma colheita de sangue da veia cava caudal do animal e realização de um esfregaço sanguíneo corado com Giemsa é normalmente suficiente para detetar infeção e chegar ao diagnóstico. No entanto, este método é pouco sensível, uma vez que cessada a fase febril aguda pode ser difícil encontrar os parasitas, pois são rapidamente removidos da circulação, e em animais portadores assintomáticos ou com infeção sub-clínica existe uma baixa parasitémia. Nestes casos os testes serológicos como ELISA (do inglês *Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*) de competição ou moleculares, como PCR são a escolha para o diagnóstico definitivo. Esta última técnica tem a vantagem de identificar sub-espécies presentes e caracterizar a população de *rickettsias* presentes.

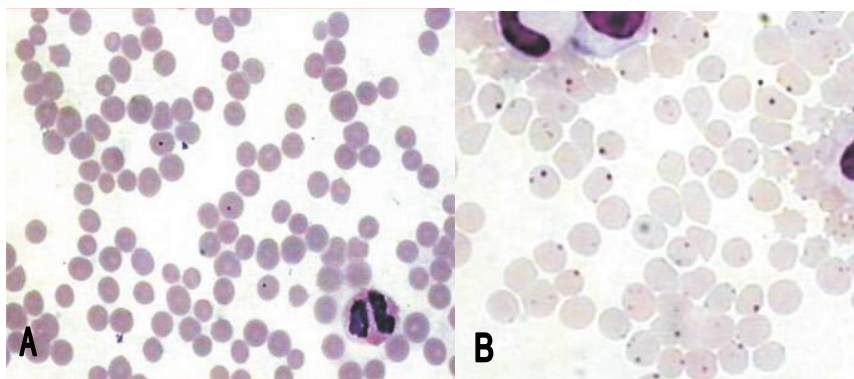


Figura 3: Esfregaços sanguíneos. A: Anaplasma marginale; B: Anaplasma centrale (Fonte: <http://www.cnpqc.embrapa.br/>)

## 4.3 Babesiose

### a) Caracterização

Em 1888, um pesquisador romeno de nome Babes descobriu a presença de um microrganismo em eritrócitos de bovinos doentes com hemoglobinúria e caracterizou-o como uma bactéria e chamou-a de *Haematococcus bovis*. No ano de 1893 dois pesquisadores americanos, Smith e Kilborne, descreveram uma enfermidade semelhante à Hematúria Enzoótica Bovina como “Febre de Texas” e associaram-na a um protozoário, o qual denominaram de *Pyrosoma bigemina* pelo seu formato em pêra. No mesmo ano, Starcovici comprovou a similaridade do microrganismo de Babes com o agente encontrado por Smith e Kilborne, e propôs a inclusão de ambos no género *Babesia*, em homenagem ao pesquisador romeno. Assim, *H. bovis* passou a ser *B. bovis* e *P. bigemina* a *B. bigemina*.

A babesiose é a doença causada pelos protozoários intra eritrocitários pertencentes ao Reino *Protista*, Sub reino *Protozoa*, filo *Apicomplexa*, subclasse *Piroplasmia*, ordem *Piroplasmida* e género *Babesia*, segundo Levine *et al.* (1980). Estes afetam animais domésticos provocando anemia e hemoglobinúria e são transmitidos por carraças da família *Ixodidae*.

Existem diversas espécies de *Babesia*, mas as que infetam bovinos e de maior importância na Europa, e consequentemente em Portugal, são *Babesia divergens*, *B. bigemina* e *B. bovis*. Estas espécies estão agrupadas em pequenas babesias, de corpos piriformes e com 1,0-2,5µm de comprimento, e em grandes babesias, com 2,5-5,0µm de comprimento. Trofozoitos de *B. bovis* são pequenos (1–1.5 µm x 0.5–1.0 µm), e normalmente encontram-se aos pares e centralmente nos eritrócitos. *B. divergens* assemelha-se com *B. bovis*, mas os pares normalmente estão numa posição mais periférica. *B. bigemina* é uma babesia grande (3–3.5 µm x 1–1.5 µm) e pode preencher o glóbulo vermelho. A variabilidade morfológica que existe entre espécies pode tornar a identificação difícil (CFSPH 2008).

As babesias são transmitidas por carraças e também como as theilerias, sofrem um ciclo com duas fases: uma fase no vetor, onde ocorre reprodução sexuada (gametogonia) e assexuada (esporogonia), e outra no hospedeiro definitivo, em que o protozoário apenas se reproduz assexuadamente (esquizogonia) (Fig.4). Quando a carraça fêmea se alimenta, ingere as babesias sob a forma de gametócitos, que se desenvolvem em micro e macrogametócitos, e após fecundação no intestino do vetor, surge o zigoto.

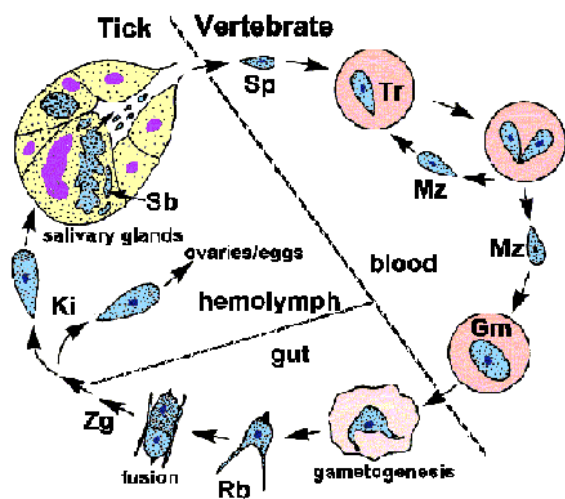


Figura 4: Ciclo de vida de *Babesias spp.*

Sp: esporozoíto, Mz: merozoíto, Gm: gametócito, Zg: zigoto, Ki: cineto. Fonte:

<http://www.hepatit.com/en/what-is-babesiosis.html>

Este dá origem a um cineto móvel que migra até às glândulas salivares e ovários do vetor, através da hemolinfa. Nesses tecidos ocorre um processo de esporogonia, originando esporozoítos - estágio infetante para o hospedeiro vertebrado. Nos ovários, as babesias invadem os ovos e continuam a multiplicar-se nos tecidos das larvas eclodidas – infecção transovárica (Urquhart *et al.* 1998). Esta forma de infecção só acontece em algumas espécies de *Babesia* e espécies de carrapatos. *B. divergens* pode sobreviver na população de carrapatos por quatro

anos, mesmo se não estiver em contacto com uma população de bovinos (Zintl *et al.* 2003).

Quando a mesma carrapa volta a alimentar-se infeta um novo mamífero e transmite o parasita aos seguintes estágios do seu desenvolvimento – infecção transtadial. Uma vez no animal vertebrado, os esporozoítos invadem os eritrócitos, tornando-se trofozoítos com as formas tipicamente piriformes (observáveis em esfregaços sanguíneos). Estes multiplicam-se assexuadamente, por fissão binária, originando merozoítos que são libertados por lise dos eritrócitos e infetam outras células sanguíneas. O fenómeno repete-se causando diferentes graus de anemia e outros efeitos resultantes da hemoglobina livre circulante

## b) Epidemiologia

A ocorrência de babesiose depende de vários fatores. A virulência da espécie particular de babesia irá influenciar a severidade da doença e as taxas de morbidade e mortalidade. *B. bovis* é a espécie mais patogénica encontrada em bovinos (Urquhart *et al.* 1998).

Relativamente ao hospedeiro, a idade é algo a considerar e conhece-se uma certa resistência de infecção em animais jovens, comparando com animais adultos, não se conhecendo a razão para tal. O seu estado imune é um dos fatores mais importantes. Em regiões endémicas, os bezerros adquirem imunidade passiva através da ingestão de colostro de progenitoras que já tiveram contacto anterior com o parasita, e sofre apenas infeções transitórias com discreta sintomatologia. Essas

infecções são suficientes para induzir uma imunidade ativa, protegendo os animais da manifestação clínica, mas eles serão portadores, por muitos meses e/ou anos, e reservatórios para a infecção de carraças e outros animais (Urquhart *et al.* 1998).

A presença de vetores específicos na região e a sua carga interferem com a manifestação de babesiose, que é mais comum nas áreas tropicais e subtropicais.

Em zonas endêmicas, onde há muitos vetores infetados, a imunidade do hospedeiro mantém-se a um nível alto e “estável”, atingindo um “equilíbrio enzoótico”. Pelo contrário, em zonas com baixa carga de carraças, o estado imunitário da população animal é também baixo. Se em certas circunstâncias o número de vetores aumentar devido a alterações climáticas ou à diminuição do tratamento dos animais e terrenos com acaricidas, ou se animais não indomnes são introduzidos em zonas endêmicas, a incidência de babesiose pode aumentar.

O aparecimento ocasional da doença pode também acontecer, particularmente em animais adultos, se existiu alguma situação de grande stress, como o parto, fome, transporte ou a presença de outra patologia concomitante.

A raça também tem influência na suscetibilidade à infecção. Está descrito que *Bos indicus* e cruzados de *Bos indicus* com *Bos taurus* são mais resistentes que animais *B. taurus* (CFSPH 2008).

*B. bovis* e *B. bigemina* são as espécies mais importantes na Ásia, África, América Central e do Sul, partes da Europa do Sul e Austrália. Apesar de *B. bovis* ser normalmente encontrada nas mesmas áreas que *B. bigemina*, grupos ligeiramente diferentes de vetores transmitem estas duas espécies e algumas diferenças na sua distribuição podem ser encontradas. *B. divergens* é um parasita muito importante na Europa, incluindo Reino Unido, Espanha e Norte da Europa (CFSPH 2008).

Em Portugal são poucos os estudos epidemiológicos conhecidos em relação a *Babesia spp.* Em 2009 foi realizado o primeiro estudo para determinar a prevalência de *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* na população de bovinos em regiões portuguesas consideradas endêmicas. Foram colhidos no total 406 amostras de sangue de animais saudáveis das regiões de Santarém, Setúbal, Beja e Évora. Como testes de diagnóstico foram utilizados um teste de ELISA indireto e um teste de PCR. Os testes serológicos revelaram que 79% e 52% dos animais possuíam anticorpos contra *B. bovis* e *B. bigemina*, respetivamente, enquanto que o PCR detetou 45% de animais com infecção simples por *B. bovis*, 8% com *B. bigemina* e 25% de animais com infecção mista (com presença de ambas as espécies). Os resultados encontrados mostram que existe realmente uma prevalência alta em Portugal de reservatórios de babesias em regiões consideradas endêmicas, e é uma preocupação podendo a sua

disseminação ser facilitada devido ao movimento de animais, no interior do próprio país ou para outro país.

### **c) Sintomatologia**

A doença ocorre normalmente uma a três semanas após a alimentação do vetor infetado. O período de incubação depende das espécies transmitidas: *B. bigemina* demora 4 a 5 dias e *B. bovis* 10 a 12 dias.

Os animais começam por ficar prostrados, deprimidos, afastam-se do grupo onde estão e deixam de comer. A febre é normalmente o primeiro sinal clínico a surgir. Os outros sinais característicos da babesiose são causados essencialmente pela hemólise e anemia. Inicialmente as mucosas tornam-se pálidas e os ritmos cardíaco e respiratório aumentam, devido à anóxia inerente à destruição dos eritrócitos. A contínua e rápida anemia verificada tem como consequência hemoglobulinemia e bilirrubinemia (manifestando-se por icterícia e as mucosas tornam-se amarelas) e hemoglobinúria, e os animais apresentam uma urina de cor vermelha escura, sugestiva de babesiose. Estes dois sinais são maus prognósticos. Diarreia, atonia ruminal e dispneia grave podem desenvolver-se em animais mais severamente afetados. Pode também causar aborto em animais gestantes, diminuindo as taxas de fertilidade das explorações.

Se não for instaurado nenhum tratamento, os animais afetados normalmente morrem na fase mais tardia da doença. Os que sobrevivem são animais mais fracos e com menores condições corporais.

Em certos casos de infeções por *B. bovis*, hemoglobinúria e hemoglobulinemia não são sinais comuns, mas podem surgir sinais neurológicos, devido ao sequestro de eritrócitos afetados pelos capilares cerebrais. A maioria desses animais morre.

As infeções por *B. divergens* podem ser moderadas a severas e os sinais neurológicos devidos a esta espécie são raros, mas podem ocorrer devido à anemia que causa anóxia cerebral (CFSPH 2008).

### **d) Diagnóstico**

Tal como na anaplasmose, a história clínica, a presença dos vetores e a sintomatologia clínica são as primeiras pistas que ajudam a chegar ao diagnóstico de babesiose. Animais com febre, anemia, icterícia e hemoglobinúria são muito suspeitos.

Os parasitas podem ser mais facilmente encontrados no sangue e nos tecidos quando a infeção é aguda. É possível observar-se em esfregaços sanguíneos os trofozoítos das babesias no interior dos eritrócitos, quase sempre isoladas ou, se em pares, estão em ângulos característicos, com as extremidades estreitas opostas. Têm

como forma típica a de pêra (piriformes), mas podem ser redondas, alongadas ou em forma de “charuto” (Urquhart *et al.* 1998) (Fig.5).

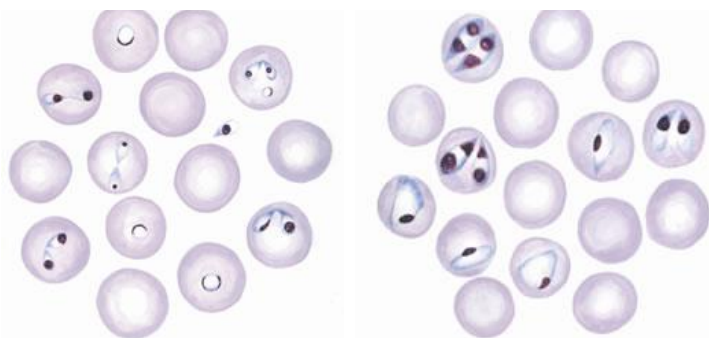


Figura 5: Eritrócitos infetados com *Babesia* spp. A: *B. bovis*; B: *B. bigemina*. (Fonte: <http://www.daff.qld.gov.au/>)

Como já referido anteriormente, este método é pouco sensível. É difícil distinguir morfologicamente as espécies de *Babesia*, estando dependente da experiência de observação do técnico (Santos 2011).

Por isso o diagnóstico deverá ser complementado, sempre que possível, por testes serológicos e moleculares.

Os testes serológicos podem detetar animais infetados mas são mais utilizados em testes de vigilância e certificação para exportação. Anticorpos para *Babesia* são por rotina detetados por hemaglutinação, fixação do complemento, imunofluorescência indirecta e ELISA, mas nestes casos reações cruzadas podem complicar a diferenciação entre espécies (CFSPH 2008, Urquhart *et al.* 1998).

O PCR permite detetar espécies de *Babesia* diferentes e são muito úteis para identificar portadores (animais infetados e assintomáticos). Apesar das suas grandes potencialidades, os testes moleculares continuam a apresentar limitações, como custos elevados, o recurso a recursos humanos qualificados, morosidade e a probabilidade de ocorrerem resultados falsos positivos ou negativos, devido à diversidade genética e antigénica dos parasitas dependente da distribuição geográfica.

### 4.3. Theileriose

#### a) Caracterização

Theileriose é uma doença causada por parasitas intra celulares obrigatórios pertencentes ao Filo *Protista*, Sub reino *Protozoa*, Filo *Apicomplexa*, Classe *Esporozoa*, Ordem *Piroplasmida*, Família *Theileriidae* e género *Theileria*. A especificação de muitas espécies de *Theileria* é ainda um assunto controverso, mas as mais importantes que afetam bovinos, ou seja, as mais patogénicas, são a *Theileria annulatus* e *T. parva*, responsáveis pela Theileriose Tropical ou Mediterrânica e a Febre da Costa Leste, respetivamente. Outras espécies menos patogénicas podem também ser encontradas em bovinos, como *T. buffelis*, *T. orientalis* e *T. sergenti*.

As *theilerias* são transmitidas por carrças e têm um ciclo de vida semelhante à das *babesias*. As únicas diferenças são as células alvo no hospedeiro definitivo e o tipo de transmissão no vetor (ocorre apenas a transmissão transestadial). Após inoculação dos esporozoítos no bovino, o protozoário infeta rapidamente os linfócitos numa glândula linfática associada. Nos linfócitos ocorre a formação de esquizontes e a indução da proliferação da célula-alvo. A velocidade da divisão celular é tal que pode ocorrer um aumento de dez vezes de células infetadas a cada três dias, justificando o caráter proliferativo da doença (animal apresenta linfadenomegália) (Urquhart *et al.* 1998) Aproximadamente 12 dias após a infeção ocorre a fase de merogonia, e os esquizontes diferenciam-se em merozoítos, que são libertados por lise dos linfócitos e invadem os eritrócitos. Os piroplasmas não se multiplicam nos glóbulos vermelhos e são assim ingeridos pelas larvas ou ninfas, aquando a sua alimentação.

### **b) Epidemiologia**

A Febre da Costa Leste ocorre essencialmente na África Oriental e Central, por ser a região onde é possível encontrar o vetor *R. appendiculatus*. Este é mais ativo após o início das chuvas, e os surtos desta doença podem ser sazonais ou, se as chuvas forem constantes, podem ocorrer em qualquer ocasião. Os animais nativos, criados em áreas endémicas, apresentam resistência natural e bovinos introduzidos nestas áreas endémicas sofrem alta mortalidade, que pode ser de 100% (Urquhart *et al.* 1998).

A Theileriose Tropical ou Mediterrânica distribui-se pela África do Norte, sul da Europa (incluindo Portugal e Espanha), Oriente Médio, Ásia e China. Também como na Febre da Costa Leste, os bovinos de regiões endémicas são relativamente resistentes à infeção e em animais mais velhos a produção de carne e leite está reduzida. No entanto, a percentagem de mortalidade em animais suscetíveis neste caso é mais reduzida (pode atingir os 70%) (Urquhart *et al.* 1998). Raças europeias de alta produção são particularmente suscetíveis à doença (OIE 2008).

Em 2010, Silva *et al.* realizaram um estudo de deteção de espécies de *Babesia* e *Theileria* em bovinos em Portugal. 1104 amostras de sangue de bovinos saudáveis, escolhidos aleatoriamente, provenientes das regiões de Santarém, Setúbal, Évora e Beja foram analisadas por uma técnica de hibridação reversa em membrana (RLB do inglês *Reverse Line Blotting*), após PCR. 75% dos bovinos eram positivos a *Babesia* e/ou *Theileria* e foram identificadas cinco diferentes espécies: *B. divergens*, *B. bovis*, *B. bigemina*, *Theileria buffeli* e *T. annulata*. A infeção por *Theileria* foi superior à infeção por *Babesia*, sendo *T. buffeli* a espécie de *Theileria* mais encontrada, estando presente em 70% dos animais, sendo como infeção singular (52%) ou mista (18%).

Foram encontrados bovinos positivos em todas as regiões selecionadas, mas a região com maior prevalência foi Évora (96%) e a raça mais afetada a Limousin (82%).

### c) Sintomatologia

Os sinais clínicos de Theileriose são inespecíficos, podendo ser confundidos com outras doenças.

O primeiro sinal a surgir, aproximadamente uma semana após inoculação pela carraça num animal suscetível é a tumefação do gânglio linfático que drena a área da picada. Posteriormente é perceptível uma linfadenomegalia superficial generalizada. O animal encontra-se febril e o aumento de temperatura pode ser rápido e elevado (chegando aos 42°C), desenvolve anorexia e perde condição corporal. Podem ocorrer hemorragias petequiais nas mucosas da conjuntiva e cavidade bucal. Outros sinais que podem também estar presentes são o lacrimejo, opacidade da córnea, descargas nasais, dispneia terminal e diarreia sanguinolenta.

Numa fase terminal, os animais ficam em decúbito, hipotérmicos e com uma grave dispneia devido ao edema pulmonar e descargas nasais, precedendo a morte.

Em certos casos pode ocorrer uma síndrome neurológica, devido a agregações intra e extra vasculares de linfócitos infetados, causando trombozes e necrose isquémica cerebral.

Na Theileriose Tropical, a sintomatologia é inicialmente semelhante à da Febre da Costa

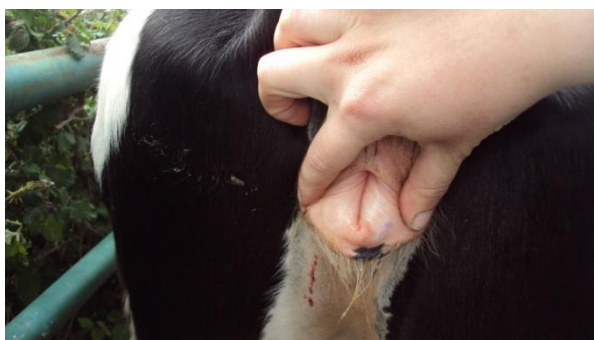


Figura 6: Mucosas pálidas em bovino infetado por *T. annulata* – animal 16. (Foto tirada durante estágio)

Leste, mas nos estágios posteriores há anemia hemolítica (Fig. 6) e frequentemente icterícia. Em infeções agudas, a morte pode ocorrer 15 a 25 dias após infeção.

A maioria dos animais que sobrevive à Theileriose torna-se portadores assintomáticos, e uma minoria pode ficar cronicamente afetados, tornando-se bezerros débeis e pequenos, ou animais adultos com baixa produtividade (OIE 2008).

### d) Diagnóstico

A história e sintomatologia clínica e a presença de vetores específicos para a transmissão de *Theileria* apenas permitem um diagnóstico presuntivo de Theileriose. Este só deve ser definitivo após a observação e identificação dos parasitas, ou por realização de esfregaços, ou pelo recurso a testes serológicos e/ou moleculares (OIE 2008).

Para o exame microscópico são necessárias amostras de sangue e/ou material obtido por biopsias de gânglios linfáticos, nos animais vivos, ou esfregaços por aposição de material obtido *post-mortem*, de tecidos como o pulmão, baço, rim e gânglios linfáticos. É possível observar-se os merozoítos nos eritrócitos, no caso da *T. annulata* (Fig.7), ou de esquizontes nos linfócitos provenientes dos esfregaços sanguíneos e/ou biopsias. Através deste método é possível analisar a morfologia dos parasitas e distingui-los.

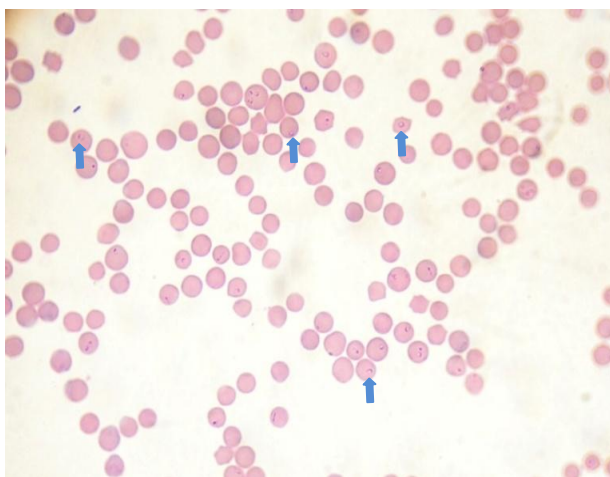


Figura 7: Esfregaço sanguíneo do animal 16 com presença de *Theileria annulata* e *Babesia spp.*(Foto tirada do MO do laboratório da CLILEGRE)

Os testes serológicos são os testes mais utilizados em estudos epidemiológicos em animais saudáveis e portadores crônicos de theileriose (Silva *et al.* 2010). São mais sensíveis que os exames microscópicos, pois os títulos de anticorpos são significativamente mais elevados na fase final do que na fase inicial da infecção (Fernandes 2010). O teste mundialmente mais usado é o teste de imunofluorescência indireta (IFA), mas tem como desvantagem

apresentar problemas de especificidade devido a reações cruzadas entre espécies próximas (*Theileria* e *Babesia*), o que condiciona a aplicação deste teste em estudos epidemiológicos de grande escala (Santos 2011, OIE 2008).

Os testes de ELISA apresentam vantagens em relação aos testes de IFA por serem mais fáceis de utilizar e permitirem o processamento de um maior número de amostras. São testes que se baseiam na detecção de anticorpos ou antígenos específicos. No entanto ELISA continua a apresentar reações cruzadas entre espécies parecidas. (Santos 2011).

As técnicas de diagnóstico molecular são os testes com maior sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de theileriose (Fernandes 2010). Para detetar e distinguir espécies de *Theileria* pode-se recorrer à técnica de PCR e várias regiões genómicas já foram usadas como alvos nestes testes: o gene do rDNA (do inglês *recombinant deoxyribonucleic acid*) 18S, gene de *Tams1* que codifica antígenos de superfície, e proteínas como o Citocromo b. O gene rDNA 18S é também o gene alvo para testes que têm como objetivo conhecer as relações filogenéticas entre as espécies. São vários os estudos atualmente realizados baseando-se nesta técnica e genes para conhecer a variabilidade inter e intra-específica de *Theileria* (Santos 2011).

É normal encontrar no mesmo animal infeções mistas de protozoários e erliquias, sendo necessário um teste que os detete e os diferencie, em simultâneo. O teste de hibridação por RLB baseia-se na hibridação de produtos ampliados por PCR com sondas específicas, normalmente oligonucleótidos, que estão imobilizados numa membrana. Ao combinar o PCR com uma hibridização, o RLB torna-se num teste 1000 vezes mais sensível que PCR usado individualmente, e é mais económico. (Fernandes 2010).

Foram ainda produzidos novas variantes do PCR, como o PCR em tempo real, que introduz novas vantagens, como a visualização em direto do decorrer da reação ao longo dos ciclos e registo dessas evoluções, assim como a quantificação do parasita. Esta técnica baseia-se na deteção de fluorescência, através da utilização de um corante não específico intercalante de ácidos nucleicos ou através de sondas oligonucleotídicas específicas (Santos 2011).

## **5. Tratamento e prevenção de hemoparasitoses em bovinos**

A eficácia do tratamento da “Febre da Carraça” depende da rapidez com que este é instaurado (quanto mais precoce, melhor eficácia), o que depende de um rápido diagnóstico, do estado geral do animal, da espécie que está em causa e dos medicamentos disponíveis.

Se o animal apresentar uma anemia severa e anóxia, icterícia ou mucosas pálidas ou temperatura inferior a 38°C está indicado a transfusão sanguínea e a utilização de fluidoterapia anti-choque. Em animais com doença crónica e em convalescença são indicados uma boa dieta e administração de vitaminas, eletrólitos e ferro. Em infeções agudas, antioxidantes como vitamina E e corticoesteróides estão também indicados.

O dipropionato de imidocarb (Imizol®- Fig.8C) tem sido o composto mais usado nos últimos 30 anos para tratar hemoparasitoses. Nos EUA esta substância está restrita ao tratamento de babesiose canina, devido ao período prolongado de retenção da droga nos tecidos dos animais de produção. Em Portugal, para bovinos com infeções onde o agente causador é desconhecido, nas infeções mistas (*Anaplasma* + *Babesia*) ou na anaplasmosose está recomendada a dose de 1 mL/40 kg de peso vivo (PV), via subcutânea (SC).

No tratamento de anaplasmosose e babesiose estão também indicadas as tetraciclinas, mas os estudos e resultados são muitas vezes contraditórios. Nos EUA a clortetraciclina e a oxitetraciclina são os únicos compostos permitidos nos bovinos.

Blouin *et al.* (2002) trataram um sistema de culturas de células derivadas de uma linha de células embrionárias de *Ixodes scapularis* infetadas com *A. marginale* com diferentes doses de oxitetraciclina e avaliaram a eliminação da infecção com um teste de ELISA indireto e observação das culturas a microscópio eletrônico. Concluíram que todas as doses de tetraciclina usadas (de 5 a 100µg/ml) tiveram 100% de eficácia na eliminação de infecção. No entanto há que ter em conta que este estudo usou um sistema de células *in vitro*, e não foi um estudo para medir a eficácia destes tratamentos *in vivo*. Por outro lado, Coetzee *et al* testaram a eficácia de três protocolos com doses diferentes de oxitetraciclina em animais persistentemente infetados e usaram como testes de medição de infecção ELISA e PCR após 60 dias de tratamento. Apesar dos protocolos usados terem provocado uma diminuição da parasitemia inicial, todos falharam na eliminação total do parasita.

Em relação à babesiose, durante muitos anos, três fármacos estavam disponíveis na maioria dos países da Europa, para utilização no seu tratamento. Eram eles o sulfato de quinina, amicarbalida e aceturato de diminazeno (Berenil® - Fig.8A).

Sulfato de quinina e amicarbalida foram retirados do mercado devido a problemas de segurança de fabrico e o Berenil® é muito utilizado nos países tropicais. Este fármaco é preparado de forma extemporânea, dissolvendo a saqueta de 2,36mg (1,05g de princípio ativo) em 12,5ml de água para injetáveis. A dose administrada deve ser de 3,5mg de substância ativa/kg PV, SC ou intramuscular (IM) no caso dos bovinos. É bem tolerado, tem uma grande margem de segurança e confere aos animais uma proteção de 2 semanas contra *B. bovis* e 4 semanas contra *B. bigemina*. Também provou ter alguma ação contra os primeiros estados de *Theileria spp.* e está indicada em infeções mistas pelos hemoparasitas *Anaplasma* e *Babesia* ou quando ocorre infecção bacteriana (Fernandes 2010). Foi retirado da Europa por razões de marketing.

Quanto à Theileriose, existem muitas drogas que estão descritas na sua terapêutica, como as tetraciclina, oxitetraciclina de longa ação, a diaminazina, coccidiostáticos como halofuginona e as naftoquinonas. No entanto, apenas o último grupo revela um maior sucesso no tratamento desta parasitose. Os restantes são usados em conjunto com as naftoquinonas.

O coccidiostático halofuginona é um fármaco controverso, uma vez que existem estudos que demonstram uma eficácia, *in vitro*, contra as espécies *T. parva* e *T. annulata* e noutros estudos mostram que não é a melhor escolha por ter doses terapêuticas muito próximas das doses tóxicas (Fernandes 2010).



Figura 8: Alguns fármacos usados contra hemoparasitose: A: Aceturato de Diminazeno- Berenil®; B: Buparvaquona - Butalex®; C: Dipropionato de Imidocarb- Imizol® (Fonte: www.google.com)

A parvaquona e a buparvaquona (Butalex®- Fig.8B) pertencem ao grupo das naftoquinonas. Butalex® é o fármaco de eleição e, apesar de ser mais eficaz quando usado em estados iniciais da doença contra os esquizontes presentes nos linfócitos parasitados, também é eficaz na fase dos merozoítos (Shkap *et al.*, 2010, Theileriose.org). A dose recomendada de Butalex® é de 2,5 mg/kg PV, administrada por via IM, em uma ou duas doses (dependendo da severidade da doença), com um intervalo de 48 horas. Este fármaco, quando associado a outras drogas, como a oxitetraciclina, pode ter um efeito potenciado e vantajoso em casos de infecções mistas, por espécies dos géneros *Anaplasma* e *Babesia* (Muhammad *et al.* 1999).

Apesar da sua popularidade como droga anti-theileriose, este grupo de fármacos apresenta uma série de limitações: não é possível eliminar por completo o parasita do hospedeiro e, apesar do animal deixar de manifestar sintomatologia clínica, este permanece num estado de portador e sem produzir leite e/ou carne durante meses, devido à extensa destruição do sistema imune causado pela doença, sendo animais suscetíveis a infeções secundárias diversas; é uma terapêutica cara; nem sempre está disponível a pequenos produtores e têm surgido estirpes resistentes a estes fármacos (Shkap *et al.*, 2010; theileriose.org).

É de realçar que em Portugal não está autorizado nenhum medicamento de uso veterinário específico para o tratamento de animais com theileriose. Os únicos permitidos são fármacos usados contra anaplasmose e babesiose, que como discutido anteriormente, não são os mais eficazes.

Normalmente só se tomam medidas quando há animais com sintomatologia. Apesar da terapia e a transfusão geralmente serem eficazes para salvar o animal, este pode continuar debilitado por vários meses após a recuperação. Portanto, por razões económicas e bem-estar animal, a melhor opção é controlar e prevenir a manifestação da patologia.

As medidas de controlo para hemoparasitoses em bovinos não mudaram muito nos últimos 60 anos. Estas podem variar dependendo da região geográfica, da espécie de parasitas presentes entre os animais, e do meio ambiente. Para um programa de controlo ser eficiente este tem de ser específico e apropriado a cada situação, e deve ser padronizado e seguido com critérios rigorosos.

Os princípios gerais para controlar hemoparasitoses são atuar sobre os vetores e impedir que os animais entrem em contacto com os mesmos. As estratégias de controlo mais usadas são desparasitação dos animais e tratamento dos terrenos, vacinação, premunição, quimioprofilaxia e metafilaxia com antibióticos. Nenhum destes métodos é suficientemente eficaz quando usado isoladamente, sendo o controlo integrado a melhor forma de atuar.

É muito difícil erradicar por completo os vetores. Em 1906, nos EUA foi iniciada uma campanha de erradicação de *B. microplus* e de *Babesiose*, através de tratamentos de desparasitação de 2 em 3 semanas com acaricidas, e atualmente é mantida pela vigilância sanitária.

Em áreas endémicas, em que a erradicação total dos vetores não é possível, devem-se tomar medidas integradas, de forma a proporcionar uma “estabilidade enzoótica”. Existe uma grande gama de acaricidas disponíveis no mercado, mas para garantir que o gado se torne infetado e imune aos parasitas com mínimos efeitos patológicos, a aplicação de acaricidas sintéticos de ação prolongada ou soluções pour-on com efeito residual nos bovinos nas épocas de maior carga de carraças é a opção mais correta. Durante o estágio foi possível constatar que os princípios mais utilizados para a desparasitação bovina são as avermectinas (doramectina e ivermectina) e a deltametrina. Na prática e em muitas explorações em extensivo o tratamento das centenas de hectares de terrenos não é praticável, sendo assim a desparasitação dos animais a medida de eleição.

Os proprietários adotaram a política de desparasitar os seus animais apenas uma vez por ano, aquando a realização da ação de saneamento anual obrigatório, e em alguns casos, a altura do ano em que é realizada é aleatória. Com as alterações do clima em Portugal e no mundo, a sazonalidade associada ao aparecimento de vetores como carraças começa a deixar de fazer sentido. Boas práticas como a quarentena de animais novos na exploração, vacinação e desparasitação dos mesmos antes de os introduzir na vacada, a realização periódica de esfregaços sanguíneos a uma amostra de animais para conhecer a população de hemoparasitas coabitantes na exploração, e um programa sanitário em que esteja programado, pelo menos, duas vezes no ano ações de desparasitação em alturas críticas (início da primavera, final do Verão, antes da altura de partos) devem começar a ser rotina. Estas medidas só

impedem a transmissão por vetores, não resolvendo situações de transmissão iatrogénica. Nestes casos as normas da boa higiene têm uma grande importância, principalmente entre veterinários e produtores.

A vacinação é uma outra medida de controlo possível de aplicar, mas ainda não existe uma vacina ideal, ou seja, que induza proteção imunitária e que reduza os efeitos da infeção dos bovinos. As vacinas disponíveis, apesar de travarem a manifestação clínica da doença, não evitam a infeção e a introdução dos hemoparasitas nos hospedeiros. Estas só se justificam em regiões endémicas e onde a vacinação de todos os animais fosse possível.

Em Portugal não são comercializadas vacinas para nenhum dos microrganismos causadores da Febre da Carraça.

Existem vacinas vivas e mortas para anaplasmoze e babesioze comercializadas mundialmente. As vacinas vivas para anaplasmoze têm como principais vantagens a imunidade conferida aos animais para a vida e não necessitarem de re-vacinação. No entanto esta vacina não confere uma imunização para diferentes genótipos de *Anaplasma*. As vacinas mortas começaram a ser comercializadas na década 60 nos EUA, e em 1999 foram retiradas do mercado.

Em relação à produção de vacinas contra a babesioze, têm sido desenvolvidos vários estudos em condições de laboratório e de campo nesta área. A maioria utiliza como vacina viva sangue de animais esplenectomizados, com formas vivas atenuadas do parasita ou inativadas. Atualmente tem-se investido em vários trabalhos para desenvolver uma nova geração de vacinas, utilizando proteínas recombinantes, apesar dos trabalhos já realizados ainda apresentarem sucessos limitados. (Gonçalves 2000)

Para *T. annulata* existe uma vacina preparada a partir de linhas celulares infetadas por esquizontes, isoladas de bovinos e atenuadas em cultura *in vitro*. Para *T. parva* não existe vacina atenuada, pois, ao contrário de *T. annulata* que entra no interior dos fagócitos e ocorre a imunização, os esquizontes de *T. parva* utilizam uma via diferente, que não ativa células fagocíticas. Assim os bovinos são inoculados com uma dose de esporozoítos provenientes de um ixodídeo e posteriormente tratados, ou com uma oxitetraciclina de longa ação, ou com clortetraciclina ou parvaquona ou buparvaquona. Estes animais permanecem imunes para o resto da sua vida (OIE 2008).

A premunicação é um método de controlo muito utilizado em alguns países, e consiste na inoculação de sangue animal portador em animais suscetíveis e com posterior tratamento com fármacos de animais que apresentem reações adversas, permitindo o desenvolvimento de imunidade contra os parasitas inoculados. No caso

da babesiose, este método é muito utilizado na Austrália, em animais com menos de 12 meses de idade que vivem em instabilidade enzoótica (Urquhart *et al.* 1998). As principais desvantagens da premunicação são a sua labilidade, o risco de disseminação de doenças como a leucose enzoótica bovina, se não houver um supervisionamento rigoroso, e a possibilidade da ocorrência da “doença hemolítica do recém-nascido”. No entanto, certos autores defendem que apesar das desvantagens associadas a este método, estas são mínimas comparadas com aquelas ocasionadas pela introdução de bovinos suscetíveis em áreas endémicas (Gonçalves 2000).

A quimioprofilaxia baseia-se no uso de drogas específicas em doses subterapêuticas. O Imizol®, já referido anteriormente, com metade da dose terapêutica permite um nível suficiente de infeção para desenvolvimento do sistema imune. No caso da Theileriose, o uso da buparvaquona funciona como método de quimioprofilaxia, uma vez que este fármaco não elimina completamente a *T. parva* e *T. annulata*, permitindo ao animal desenvolver anticorpos e tornar-se imunocompetente à infeção.

A profilaxia com antibióticos é também uma outra estratégia de controlo utilizada. Os antibióticos escolhidos são geralmente os mesmo usados no tratamento.

Apesar do leque de estratégias a aplicar, estas não têm sido eficazes no controlo de hemoparasitoses.

## **6. Trabalho desenvolvido**

### **6.1. Introdução**

Em Portugal pouco se conhece de prevalências e de incidências de hemoparasitoses, e as medidas de controlo e tratamento disponíveis para combater estas patologias são limitadas e pouco divulgadas, entre produtores, veterinários e laboratórios.

Por todas estas dificuldades, e por ser um problema diário dos clientes de campo e dos profissionais da CLILEGRE, foi realizado um estudo de prevalência de hemoparasitoses em bovinos e, paralelamente, um registo de incidências. No período de novembro de 2011 a abril de 2012 foram analisados esfregaços sanguíneos de 144 animais saudáveis, escolhidos aleatoriamente, num total de 19 explorações (exploração 1 a 19), estabelecidas nos concelhos de Portalegre, Nisa, Marvão, Castelo de Vide, Monforte e Crato. A exploração 20 aparece referenciada no estudo de incidência, mas não foi possível realizar na mesma os esfregaços para o estudo de prevalência. As amostras de sangue foram colhidas durante a visita para saneamento anual obrigatório, em explorações com efetivos superiores a 20 animais. As raças de

bovinos incluídos neste estudo são Limousine, Charolesa, Alentejana, Mertolenga, Holsteín Frísea e Cruzadas. Setenta e oito por cento eram vacas adultas, 8% machos adultos e 14% novilhas (com menos de 1 ano de idade). Para cálculo da dimensão da amostragem foi usada a fórmula indicada por Toma *et al.* 2004 em “Epidemiologia Aplicada”, para uma prevalência estimada de 40%, o que correspondeu a uma amostragem de 6 animais por exploração ou grupo. A exploração 10 foi dividida em 6 grupos, número correspondente ao número de grupos de animais existentes em locais diferentes. Os animais eram considerados positivos se ao exame microscópico fosse visível um parasita dos géneros *Anaplasma*, *Babesia* e *Theileria*. Não houve contabilização da carga parasitária de cada animal. A observação foi realizada pela estagiária e confirmada pela veterinária e/ou enfermeiro veterinário, profissionais com mais experiência nesse procedimento.

No âmbito do estudo sobre a diversidade genética na espécie de *Theileria annulata*, foram enviados 10 amostras de sangue (estando incluídos os 6 animais previstos no estudo de prevalência) das explorações 3, 9, 14, 18 e 19. No entanto, até à data da elaboração deste trabalho, só foi possível realizar o teste de PCR em duas amostras (animais 16 e 143).

Quanto à incidência, foi construída uma tabela com os casos decorrentes desde o período de setembro de 2011 a abril de 2012, e com o registo de sintomas, resultados dos testes de diagnóstico, tratamentos e evolução da doença.

Por motivos de pouca experiência e por ser utilizado apenas o exame microscópico como meio de diagnóstico, as diferentes espécies de *Babesia* e *Theileria* não foram identificadas (à exceção dos animais confirmados por PCR no LNIV). O contrário foi possível para as espécies de *Anaplasma*, pois como a sua diferenciação baseia-se na sua distribuição no eritrócito, o processo de identificação é mais simples.

## **6.2 Método e meios**

As amostras de sangue foram obtidas através da punção da veia coccígea e os esfregaços foram realizados após a colheita no local, ou na clínica, após transporte do sangue inteiro em tubos de 5ml com anticoagulante, EDTA, refrigerados. Foram realizados dois esfregaços por cada amostra e as lâminas foram identificadas com etiquetas colantes numa extremidade, com o número de SIA. Os esfregaços foram realizados segundo a técnica representada na figura 9.

A secagem foi feita com agitação da lâmina no ar, quando realizados em campo, ou com o auxílio de um secador, se realizados na clínica. Só os esfregaços delgados, com uma única camada sem superposição, nem formação de grãos ou flocos e completos foram corados.

Após coloração com *Diff-Quick*, os esfregaços eram lavados com água e secavam ao ar, pelo menos durante 2 horas, antes da sua visualização. A observação dos esfregaços sanguíneos realizou-se em microscópio ótico, utilizando uma ocular de 10 X e objectiva de 100 X, com uma ampliação total de 1000x, com óleo de imersão. Cada esfregaço foi objeto de 2 a 3 observações para confirmação do diagnóstico.

As amostras de sangue colhidas para análise da técnica de PCR foram colhidas da mesma forma anteriormente descrita, e contidas em tubos de 5 mL com EDTA, e refrigerados até a realização de esfregaços e posteriormente congelados até serem processadas. No LNIV foram realizados esfregaços sanguíneos de todas as amostras e corados com Hemacolor®. Para a extração de DNA foi utilizado o *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche), de acordo com as instruções dos fabricantes. A concentração de DNA total extraído das amostras foi determinada por espectrofotometria (*Nanodrop® 2000*, Thermo Scientific). Foi utilizado um par de *primers* específicos para *T. annulata* com alvos complementares para o gene *Tams1* e que amplificam um fragmento de 319 pares de base (pb). A mistura de amplificação continha 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada desoxinucleótidos constituintes do DNA (dNTP), 0,8 µM dos dois *primers* (Tannul\_F e Tannul\_R), 1 U de *DNA polymerase (Taq)*, 1X do respetivo tampão, água até perfazer volume pretendido e DNA da amostra ou do controlo positivo. As reações foram realizadas num termociclador automático de DNA (*MJ Mini™*, BioRad- Fig.10A), com as seguintes condições: um ciclo inicial de desnaturação a 94 °C durante 10

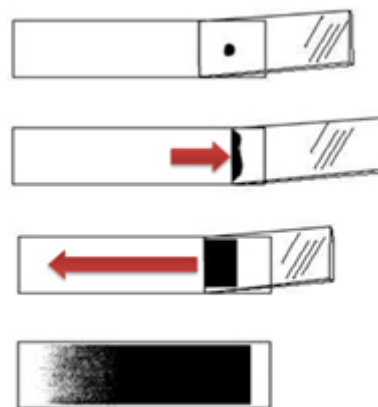


Figura 9: Técnica de esfregaço. Ângulo entre as duas lâminas: 45° (Fonte: <http://biomedicina.brasil.blogspot.pt>)

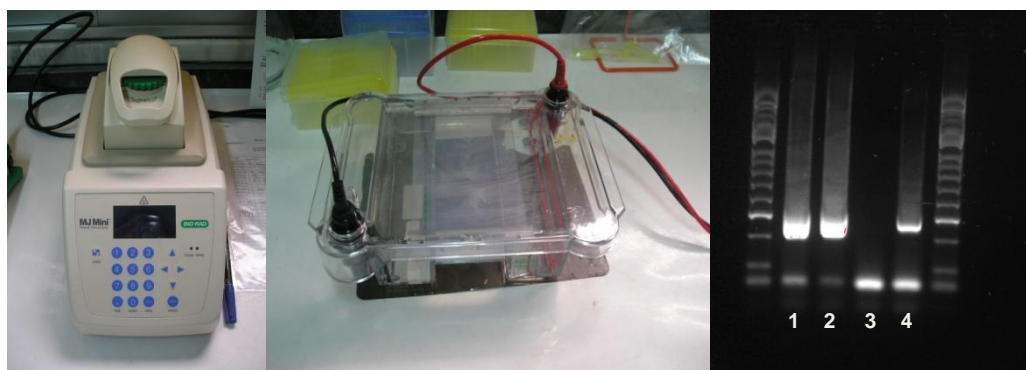


Figura 10: Passos da técnica de PCR. A: termociclador automático de DNA; B: eletroforese num banho de *GelRed*; C: resultados PCR para *T. annulata* – 1:amostra LC19 (animal 143); 2:amostra LC23 (animal 16); 3:controlo negativo; 4: controlo positivo. (Fotos tiradas no LNIV)

minutos, seguido de 34 ciclos de desnaturação a 94 °C durante 30 segundos, hibridação a 55 °C durante 30 segundos e extensão a 72 °C durante 45 segundos, acabando com um passo final de extensão de 72 °C durante 10 minutos. Os produtos de amplificação das reações de PCR foram submetidos a eletroforese a 90 V durante 90 minutos, num banho de *GelRed* (Fig.10B). Posteriormente, os padrões de DNA (Fig.10C) foram captados por um sistema de imagem digital *UVP BioDoc-It™ Imaging System* (Upland, California, USA).

### 6.3 Resultados

Das 19 explorações incluídas no estudo, 17 (89%) possuíam animais portadores de hemoparasitas e apenas 2 (11%) eram negativas. De um total de 2444 animais foram seleccionados 144 animais para realização de esfregaços sanguíneos, dos quais 69% (99 animais) estavam parasitados e 31% (45 animais) eram negativos. Dos animais positivos, 60% tinham infeções singulares e 40% possuíam mais do que um género de parasita. A combinação *Anaplasma marginale* e *Babesia spp.* foi a mais encontrada, e *Anaplasma marginale* e *Theileria spp.* a menos encontrada. Não surgiram infeções mistas com os três géneros.

O género com maior prevalência foi *Babesia spp.* com 63% e *Theileria spp.* foi o género menos encontrado na população bovina, com uma percentagem de 34%. Em todos os géneros a percentagem de infeção mista é maior que a singular (encontram-se na maioria das vezes em conjunto com um outro género).

	Nº animais		
	Positivos	Total	Percentagem
<b>Prevalência</b>	99	144	69%
Infeção singular	59	99	60%
<i>Anaplasma marginale</i>	16	59	27%
<i>Babesia spp.</i>	29	59	49%
<i>Theileria spp.</i>	14	59	24%
Infeção mista	40	99	40%
<i>Anaplasma marginale</i> e <i>Babesia spp.</i>	20	40	50%
<i>Anaplasma marginale</i> e <i>Theileria spp.</i>	7	40	18%
<i>Babesia spp.</i> e <i>Theileria spp.</i>	13	40	32%
<b>Hemoparasitas</b>			
<i>Anaplasma marginale</i>	43	99	43%
Infeção singular	16	43	37%
Infeção mista	27	43	63%
<i>Babesia spp.</i>	62	99	63%
Infeção singular	30	62	48%
Infeção mista	32	62	52%
<i>Theileria spp.</i>	34	99	34%
Infeção singular	14	34	41%

Infeção mista	20	34	59%
---------------	----	----	-----

Tabela 1: Resultados de prevalências de hemoparasitas, de infecções singulares e mistas

Em relação à incidência de hemoparasitoses, durante o período de setembro de 2011 a abril de 2012 foram registados 22 casos, em 8 explorações, com diagnóstico confirmado por exame microscópico. Este número corresponde a 1% de incidência. Os parasitas mais encontrados nestes animais pertencem ao género *Babesia* (68%) e os menos encontrados ao género *Theileria* (18%).

Cinquenta e cinco por cento dos animais infetados apresentavam infeção singular, com um único tipo de parasita e 45% infeções mistas, sendo a dupla *Anaplasma marginale* e *Babesia spp.* a mais encontrada (60%).

Dos 22 animais doentes e tratados, 3 morreram devido a um estado avançado da doença, correspondendo a uma mortalidade de 14%.

	Nº animais		
	Positivos	Total	Percentagem
<b>Incidência</b>	22	2488	1%
Infeção singular	12	22	55%
Infeção mista	10	22	45%
<i>Anaplasma marginale</i> e <i>Babesia spp.</i>	6	10	60%
<i>Babesia spp.</i> e <i>Theileria spp.</i>	4	10	40%
<b>Mortalidade</b>	3	22	14%
<b>Hemoparasitas</b>			
<i>Anaplasma marginale</i>	11	22	50%
Infeção singular	5	11	45%
Infeção mista	6	11	55%
<i>Babesia spp.</i>	15	22	68%
Infeção singular	5	15	33%
Infeção mista	10	15	67%
<i>Theileria spp.</i>	4	22	18%
Infeção singular	2	4	50%
Infeção mista	2	4	50%

Tabela 2: Resultados de incidências de hemoparasitas, de infecções singulares e mistas e taxa de mortalidade

Em relação aos resultados das duas amostras submetidas a PCR para *Theileria annulata*, ambas foram positivas.

#### 6.4 Discussão

Perante os resultados obtidos pode-se afirmar que os valores de prevalência, de um modo geral, são elevados, o que corresponde ao esperado, uma vez que a região de Portalegre reúne condições ideais para o desenvolvimento de vetores

disseminação dos parasitas (clima e modo de produção de animais). O método de diagnóstico aplicado não é dos métodos mais sensíveis, por isso as prevalências reais podem ser mais altas do que as obtidas.

*Babesia spp.* foi o parasita mais encontrado, o que é preocupante, pois é um dos géneros mais “graves” de hemoparasitoses, a seguir a *Theileria spp.* Para este último género, apesar de ser o menos prevalente, a sua prevalência foi mais alta do que a inicialmente esperada. Em relação a *Anaplasma marginale*, o valor obtido (43%) pode estar aumentado, devido à existência de artefactos nos esfregaços que induzem em erro no diagnóstico.

A incidência de hemoparasitoses encontrada é muito baixa e não corresponde à realidade, sendo que os casos registados foram de animais que, durante a ação de saneamento chamavam a atenção por se encontrarem mais prostrados e anémicos. A baixa incidência registada pode ser resultado da prática comum na região, porque normalmente são os próprios produtores que na prática diária identificam os sinais típicos nos animais, como por exemplo anemia e icterícia, e aplicam o tratamento, não procurando os serviços veterinários, nem registando os casos. Os parasitas detetados em animais doentes correspondem aos encontrados no estudo de prevalência: *Babesia spp.* foi o parasita mais encontrado e *Theileria spp.* o menos presente. A taxa de mortalidade registada é moderada, e os animais que faleceram foram tratados mas apresentavam-se num estado geral mau e num quadro avançado da doença. Todos eles manifestaram sintomatologia após uma situação de stress (fome e parto). Após realização de exame microscópico dos mesmos, foi possível constatar que todos apresentavam infeção mista, estando *Babesia spp.* presente em todos os animais. Estes resultados sugerem para a importância do diagnóstico e tratamento precoces das hemoparasitoses.

Os resultados obtidos não foram comparados com os estudos de prevalência já realizados em Portugal, porque os testes de diagnóstico utilizados são diferentes.

## **7. Conclusões finais**

Os resultados deste estudo permitem concluir que a região de Portalegre é endémica à “Febre da Carraça”, onde se confirmou a presença de todos os géneros de hemoparasitas de bovinos (*Anaplasma*, *Babesia* e *Theileria*). Fatores como mudança de clima, o não tratamento dos terrenos, a facilidade de movimento de animais, a não realização de quarentena a novos animais na exploração, conjugados com uma má política de desparasitação dos animais (apenas uma vez por ano) e de situações de stress nos animais influenciam negativamente no aparecimento e

disseminação da “Febre da Carraça”. Como em Portugal não estão disponíveis quaisquer vacinas, é extremamente importante apostar-se no controlo dos vetores e profilaxia com fármacos. Sendo a presença de *Theileria spp.* uma realidade na região de Portalegre e noutras regiões de Portugal, é importante no futuro ser disponibilizado um medicamento de uso veterinário específico para o tratamento de theileriose. Mais estudos de prevalência destes parasitas na população bovina em Portugal são urgentes, para melhor compreender a situação epidemiológica do país, as taxas de morbidade e mortalidade, e encontrar as melhores medidas de prevenção.

A realização deste estudo e experiências adquiridas durante o período de estágio permitem concluir que é necessária e importante a divulgação dos resultados obtidos como forma de alertar os profissionais da Medicina Veterinária, produtores de animais de pecuária e laboratórios para a importância das doenças transmitidas por carraças na região. Sendo o Alto Alentejo uma região com milhares de hectares disponíveis para pastagem, o tratamento dos terrenos com acaricidas torna-se difícil, mas a rotação de pastos (mudança de animais para outros terrenos) e a desparasitação dos animais pelo menos duas vezes ao ano, preferencialmente com produtos de longa acção pour-on, em alturas de maior atividade das carraças (no início de primavera e final do verão, podendo aumentar a frequência entre este período), ou quando animais mudam de pasto, deve ser uma política a adotar pelos produtores, mesmo que os vetores não sejam visíveis. Cada exploração deveria elaborar o seu plano sanitário conforme o seu “perfil parasitário”. Para tal, poder-se-ia realizar alguns esfregaços sanguíneos e/ou testes serológicos e moleculares para desvendar a prevalência de hemoparasitas e as espécies presentes na exploração. Este procedimento pode ser repetido em alturas críticas de desenvolvimento dos vetores. Os casos que eventualmente surjam, confirmados de “Febre da Carraça” devem também ser registados. Os animais que são introduzidos na exploração devem ser colocados em quarentena antes de serem introduzidos na vacada e o mesmo procedimento anterior deve ser realizado. Devem ser desparasitados durante esse período, e se justificar, deve ser realizado uma profilaxia.

## 8. Bibliografia

- Antunes GM (2008) “Hemoparasitoses em Bovinos de Carne” **Tese de Mestrado Integrado na Universidade Técnica de Lisboa Faculdade de Medicina Veterinária**

- Blouin EF, Kocan KM, de la Fuente J, Saliki JT (2002) “Effect of tetracycline on development of *Anaplasma marginale* in cultured *Ixodes scapularis* cells” **Veterinary Parasitology** 107, 115-126
- Bock R, Jackson L, de Vos A, Jorgensen W (2004) “Babesiosis of cattle” **Parasitology** 129, 247–269
- “Bovine Babesiosis - The Center for Food Security and Public Health (CFSPH) 2008”, consultado em «[http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/bovine\\_babesiosis.pdf](http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/bovine_babesiosis.pdf)», no dia 02/05/2012
- Caeiro, V (1999) “General review of tick species present in Portugal” **Parassitologia** 41 Suppl 1, 11-5.
- Coetzee JF Apley MD, Kocan KM, Rurangirwa FR, Donkersgoed JV (2005) “Comparison of three oxytetracycline regimens for the treatment of persistent *Anaplasma marginale* infections in beef cattle” **Veterinary Parasitology** 127, 61-73
- “FAO corporate document repositior: Epidemiology and decision-making in theileriosis control”, consultado em «<http://www.fao.org/wairdocs/ILRI/x5549E/x5549e0x.htm>», no dia 10/05/2012
- Fernandes, JIM (2010) “Teileriose em bovinos de carne na Região do Ribatejo” **Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa**
- Instituto Nacional de Estatística (2009) “Anuário Estatístico da Região Alentejo”
- Kocan KM, de la Fuente J, Blouin EF, Coetzee JF, Ewing SA (2010) “The natural history of *Aaplasma marginale*” **Veterinary Parasitology** 167, 95-107
- “MSD Animal Health: Berenil® R.T.U. – Product Details”, consultado em «[http://www.msd-animal-health.co.za/products/berenil-rtu/020\\_product\\_details.aspx](http://www.msd-animal-health.co.za/products/berenil-rtu/020_product_details.aspx)», no dia 06/05/2012
- “MSD Saúde Animal: Imizol® – Resumo da bula”, consultado em «[http://www.msd-saude-animal.com.br/products/IMIZOL\\_/020\\_Resumo\\_da\\_Bula.aspx](http://www.msd-saude-animal.com.br/products/IMIZOL_/020_Resumo_da_Bula.aspx)», no dia 25/04/2012
- Muhamma G, Saqib M, Athar M, Khan MZ, Asi MN (1999) “Clinico-epidemiological and therapeutic aspects of bovine theileriosis” **Pakistan Vet J** 19, 64-71
- “Portalegrebiz- caracterização do distrito”, consultado em «[http://www.portalegredigital.biz/pt/conteudos/territorial/Caracteriza%C3%A7%C3%A3o%20do%20Distrito/Distrito\\_de\\_Portalegre.htm](http://www.portalegredigital.biz/pt/conteudos/territorial/Caracteriza%C3%A7%C3%A3o%20do%20Distrito/Distrito_de_Portalegre.htm)», no dia 21/05/2012

- Santos, MAF (2011) “Desenvolvimento de métodos moleculares para detecção de *Theileria annulata*” **Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Genética Molecular e Biomedicina na Universidade Técnica de Lisboa**
- Silva MG, Henriques G, Sánchez C, Marques PX, Suarez CE, Oliva A (2009) “First survey for *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* infection in cattle from Central and Southern regions of Portugal using serological and DNA detection methods” **Veterinary Parasitology** 166, 66-72
- Silva MG, Marques PX, Oliva A (2010) “Detection of *Babesia* and *Theileria* species infection in cattle from Portugal using a reverse line blotting method” **Veterinary Parasitology** 174, 199-205
- “Technical disease cards of Theileriosis: OIE – World Organization for Animal Health”, consultado em «[http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal\\_Health\\_in\\_the\\_World/docs/pdf/THEILERIOSIS\\_FINAL.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/THEILERIOSIS_FINAL.pdf)», no dia 09/05/2012
- “Technical Factsheet of Bovine Babesia of the Center for Food Security & Public Health”, consultado em «[http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/bovine\\_babesiosis.pdf](http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/bovine_babesiosis.pdf)», no dia 03/05/2012
- Trindade HI, Almeida KS, Freitas FLC (2011) “ Tristeza Parasitária Bovina – Revisão de literatura” **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária** 16, ESS: 1679-7353
- “Tropical theileriosis - Wellcome Trust Project”, consultado em «<http://www.theileria.org/ahdw/index.htm>», no dia 09/05/2012
- Urquhart GM, Armour J, Duncan JL, Dunn AM, Jennings FW (1998) “Filo PROTOZOA” **Parasitologia Veterinária**, 2ª Ed., Editora Guanabara Koogan S.A., 210-216
- “Wikipedia – Portalegre” consultado em «[http://pt.wikipedia.org/wiki/Portalegre\\_\(Portugal\)#cite\\_note-IM-1](http://pt.wikipedia.org/wiki/Portalegre_(Portugal)#cite_note-IM-1)», no dia 21/05/2012
- Zintl A, Mulcahy G, Skerrett HE, Taylor ST, Gray JS (2003) “*Babesia divergens*, a Bovine Blood Parasite of Veterinary and Zoonotic Importance” **Clinical Microbiology Reviews** vol 16 n 4, 622-636

## 9.Anexos

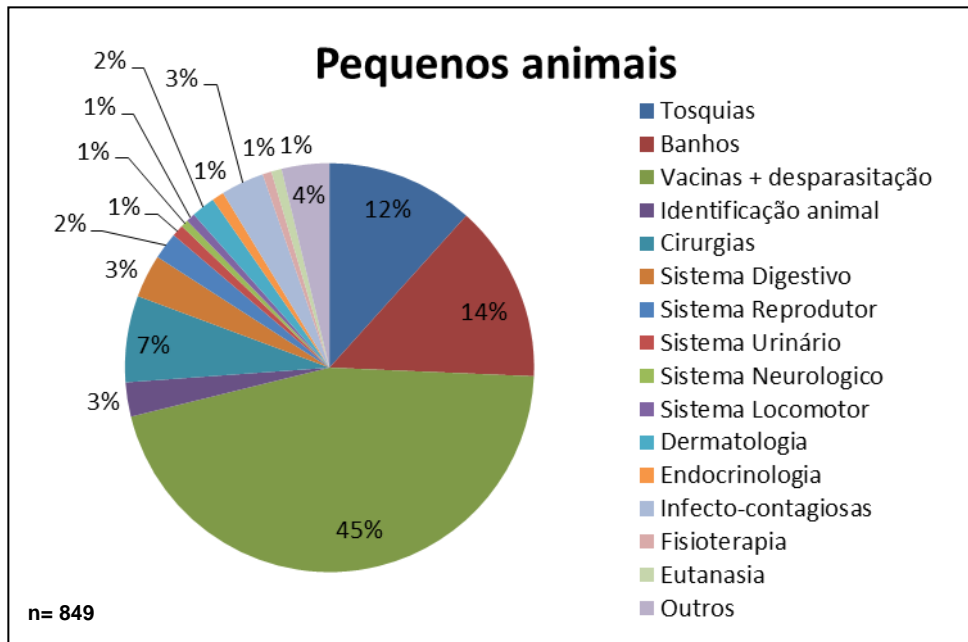


Gráfico 1: Casuística de clínica de pequenos animais. n= nº total de casos

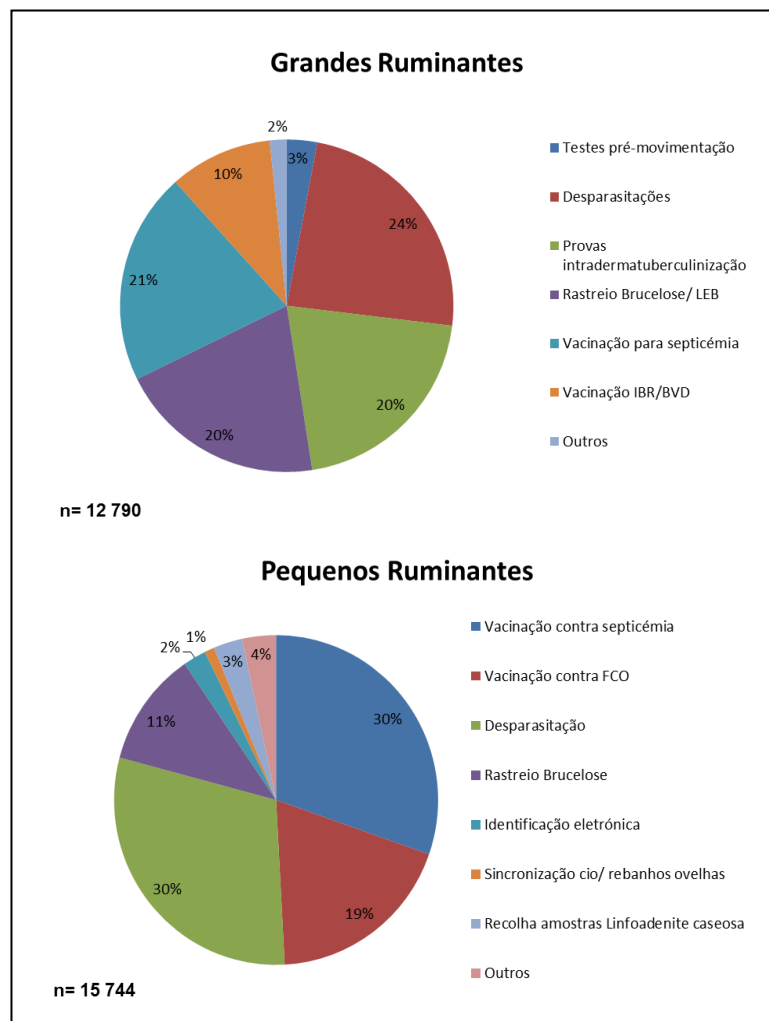


Gráfico 2: Casuística de clínica de animais de pecuária. n= nº total de animais

% Soroprevalência			
Exploração	Data	IBR GB (ELISA)	BVD p80 (ELISA)
1	07-03-2012	43%	0%
2	16-03-2012	86%	56%
3	16-03-2012	100%	89%
4	23-02-2012	100%	50%
5	07-03-2012	44%	33%
6	23-02-2012	100%	89%
Média		79%	53%

Tabela 3: Resultados de seroprevalência para BVD/IBR na região de Portalegre realizados durante estágio em colaboração com Pfizer

Microrganismo	<i>Theileria annulata</i>			24-04-2012
Sequência alvo	Tams1			[7]
Tamanho sequência	319 pb			
Primers	Tannul_F: 5'- CAA ATT CGA GAC CTA CTA CGA TG -3'			
	Tannul_R: 5'- CCA CTT (A/G) TC GTC CTT AAG CTC G-3''			

**Mistura**

Master Mix	Reagente	[Mistura]	Volume µl	4 amostras
	H2O		9,8	39,2
	Tampão 5 X	1 X	5	20
	MgCl <sub>2</sub> 25 mM	2,5 mM	2,5	10
	dNTPs 10 mM	200 µM	0,5	2
	Tannul_F 20 mM	0,8 µM	1	4
	Tannul_R 20 mM	0,8 µM	1	4
	Taq	1 U	0,2	0,8

<b>DNA</b>	Amostra, Controlo + ou Controlo -	5 µl	
	<b>Total</b>	25 µl	

**Programa**

Termociclador: MJ Mini - BioRad

Ciclos	Função	Temperatura	Duração
1	Pré-desnaturação	94°C	10 min.
34	Desnaturação	94°C	30 s
	Annealing	55°C	30 s
	Extensão	72°C	45 s
1	Extensão final	72°C	10 min.

**Amostras**

1	LC 19	(A)
2	LC 25	(B)
3	Neg.	
4	Pos.	

<b>Electroforese:</b>
90min, 90 V,
Banho GelRed

Figura 10: Ficha com protocolo da técnica de PCR usada para detecção de *T. annulata*; LC 19- animal 143 e LC 25- animal 16

PROPRIETÁRIO	FREGUESIA	CONCELHO	DATA	Nº ANIMAIS	Nº amostra	Nº S.I.A	RESULTADOS
1	MONTALVÃO	NISA	12-11-2011	48	1	PT 715152878	Anaplasma marginale e Babesia spp.
					2	PT 415884792	Anaplasma marginale e Babesia spp.
					3	PT 714321720	Anaplasma marginale e Babesia spp.
					4	PT717134032	Anaplasma marginale e Babesia spp.
					5	PT 715152860	Anaplasma marginale
					6	PT 715152877	Babesia spp.
2	MONTALVÃO	PORTALEGRE	12-11-2011	37	7	PT 114409957	Anaplasma marginale
					8	PT 514200267	Anaplasma marginale e Babesia spp.
					9	PT 215439004	Anaplasma marginale
					10	PT 514200263	Negativo
					11	PT 514200257	Babesia spp.
					12	PT 215439009	Anaplasma marginale e Babesia spp.
3	ALAGOA	PORTALEGRE	18-04-2012	40	13	PT 114475273	Theileria spp. e Babesia spp.
					14	PT 864591989	Theileria spp.
					15	PT 214396389	Theileria spp. e Babesia spp.
					16	PT 715144699	Theileria annulata e Babesia spp.
					17	PT 115042547	Theileria spp. e Babesia spp.
					18	PT 214475268	Anaplasma marginale e Theileria spp.
4	AMIEIRA DO TEJO	NISA	20-11-2011	60	19	PT 964852594	Negativo
					20	PT 714369869	Negativo
					21	s/nº	Negativo
					22	PT 464293656	Negativo
					23	PT 515436028	Babesia spp.
					24	PT 815403069	Babesia spp.
5	REGUENGO	PORTALEGRE	23-11-2011	20	25	PT 964334809	Negativo
					26	PT 164566841	Negativo
					27	PT 363458897	Negativo
					28	PT 715150119	Negativo
					29	PT 15441654	Anaplasma marginale

					30	PT 964334805	Negativo
6	ALPALHÃO	NISA	30-11-2011	36	31	PT 364089320	Negativo
					32	PT 564089329	Negativo
					33	sem brinco	Negativo
					34	PT 364089317	Negativo
					35	PT 364089324	Negativo
					36	PT 564089329	Negativo
7	MARVÃO	MARVÃO	01-12-2011	51	37	PT 615249002	Anaplasma marginale
					38	PT 114198917	Anaplasma marginale
					39	PT 965112043	Anaplasma marginale
					40	PT 065086742	Anaplasma marginale
					41	PT 615249005	Babesia spp.
					42	PT 065086750	Babesia spp.
8	VAIAMONTE	MONFORTE	07-12-2011	70	43	PT 464818328	Anaplasma marginale
					44	PT 864643713	Negativo
					45	PT 36403245	Negativo
					46	PT 663862029	Negativo
					47	PT 364032451	Negativo
					48	PT 815249105	Negativo
9	S. JOAO BATISTA	CASTELO DE VIDE	23-04-2012	267	49	PT 114981032	Babesia spp. e <i>Theileria</i> spp.
					50	PT 615219548	Theileria spp.
					51	PT 514202483	Negativo
					52	PT 114981021	Anaplasma marginale e Babesia spp.
					53	PT 564925035	Theileria spp.
					54	PT 814337150	Theileria spp.
10(1)	CRATO	CRATO	09-01-2012	230	55	PT 014370441	Anaplasma marginale e Babesia spp.
					56	PT 364949532	Babesia spp.
					57	PT 415132546	Babesia spp.
					58	PT 264158098	Anaplasma marginale e Babesia spp.
					59	PT 615132526	Anaplasma marginale e Babesia spp.
					60	PT 416043346	Babesia spp. E Theileria spp.

10(2)	CRATO	CRATO	18-01-2012	180	61	PT 315148576	Negativo
					62	PT 415132527	Babesia spp. E Theileria spp.
					63	PT 814370442	Theileria spp.
					64	IE 121657610829	Babesia spp. E Theileria spp.
					65	IE 121657640815	Anaplasma marginale
					66	PT 815043888	Anaplasma marginale
10(3)	CRATO	CRATO	19-01-2012	112	67	PT 864030129	Babesia spp.
					68	PT 464181045	Babesia spp.
					69	PT 464431690	Babesia spp.
					70	PT 514338676	Babesia spp. E Theileria spp.
					71	PT 714439512	Babesia spp. E Theileria spp.
					72	PT 864030129	Babesia spp.
11	GAFETE	CRATO	11-01-2012	340	73	PT 66437218	Anaplasma marginale e Babesia spp.
					74	PT W974511	Anaplasma marginale e Babesia spp.
					75	PT 964747098	Babesia spp.
					76	PT 564871726	Negativo
					77	PT W974501501	Babesia spp. E Theileria spp.
					78	PT 365086538	Negativo
12	ALAGOA	PORTALEGRE	09-01-2012	56	79	2440	Negativo
					80	5700	Negativo
					81	4713	Negativo
					82	1663	Negativo
					83	1062	Negativo
					84	1670	Negativo
13	URRA	PORTALEGRE	16-01-2012	250	85	PT 964334545	Anaplasma marginale e Theileira spp.
					86	PT 463496465	Anaplasma marginale e Babesia spp.
					87	PT 363496490	Theileria spp.
					88	PT 063496524	Anaplasma marginale e Theileira spp.
					89	PT 914928843	Anaplasma marginale
					90	PT 514429750	Anaplasma marginale
14	ALPALHÃO	NISA	05-04-2012	23	91	PT 915459353	Babesia spp. E Theileria spp.

					92	PT 115959338	Babesia spp.
					93	PT 815455363	Theileria spp.
					94	PT 115083275	Theileria spp.
					95	PT 319459375	Negativo
					96	PT 915459341	Babesia spp.
10(4)	CRATO	CRATO	30-01-2012	65	97	PT 517288221	Negativo
					98	PT 416092417	Anaplasma marginale e Babesia spp.
					99	PT 716942893	Babesia spp.
					100	PT 515866948	Babesia spp.
					101	PT 916942892	Anaplasma marginale e Babesia spp.
					102	PT 415866958	Babesia spp.
10(5)	CRATO	CRATO	30-01-2012	42	103	PT 315457753	Babesia spp.
					104	PT 514222608	Anaplasma marginale e Babesia spp.
					105	PT 115955243	Anaplasma marginale e Babesia spp.
					106	PT 616043369	Babesia spp.
					107	PT 164754466	Anaplasma marginale
					108	IE 281074251011	Negativo
10(6)	CRATO	CRATO	01-02-2012	150	109	PT 91735907	Anaplasma marginale e Babesia spp.
					110	PT 863222389	Anaplasma marginale e Babesia spp.
					111	PT 163206160	Babesia spp.
					112	PT 514369544	Babesia spp.
					113	PT 164800150	Babesia spp.
					114	PT 514221293	Babesia spp.
15	FORTIOS	PORTALEGRE	01-02-2012	22	115	PT 063701321	Negativo
					116	PT 663071361	Negativo
					117	PT 764054499	Babesia spp.
					118	PT 416700621	Negativo
					119	PT 063701330	Babesia spp.
					120	PT 764054497	Negativo
16	CARREIRAS	PORTALEGRE	25-03-2012	67	121	PT 964519294	Babesia spp.
					122	PT 964645184	Anaplasma marginale

					123	PT 214219683	Negativo
					124	PT464619758	Negativo
					125	PT914428442	Anaplasma marginale
					126	PT 164619769	Anaplasma marginale e Babesia spp.
17	URRA	PORTALEGRE	04-04-2012	22	127	PT 414529972	Negativo
					128	PT 263207339	Anaplasma marginale e Theileria spp.
					129	PT 665063677	Theileria spp.
					130	PT 115955243	Negativo
					131	Nº casa 006	Anaplasma marginale e Theileria spp.
					132	Nº casa 009	Anaplasma marginale e Theileria spp.
18	NISA	NISA	20-04-2012	111	133	PT 916887311	Babesia spp. E Theileria spp.
					134	PT 217160543	Theileria spp.
					135	PT 917160214	Babesia spp.
					136	PT 415114542	Theileria spp.
					137	PT 416028992	Negativo
					138	PT 017160563	Theileria spp.
19	ALPALHÃO	NISA	20-04-2012	145	139	PT 516721746	Negativo
					140	PT 265028821	Anaplasma marginale e Theileria spp.
					141	PT 915212903	Negativo
					142	PT 616721736	Theileria spp.
					143	PT 916721749	Theileria annulata
					144	PT 616721750	Babesia spp.

Tabela 4: Registo de explorações e animais submetidos a estudo de prevalência de hemoparasitoses e respetivos resultados. Cor azul: explorações selecionadas para estudo de *T. annulata*; Cor amarela: animais positivos a PCR para *T. annulata*

EXPLORAÇÃO	DATA	Nº S.I.A.	RESULTADOS	SINTOMATOLOGIA	TRATAMENTO	EVOLUÇÃO
18	09-11-2011	PT 664888740	<i>Anaplasma marginale</i>	Má condição corporal, mucosas pálidas, sem febre	Oximicina; Ivermectina; Imidocarb	Melhorou
	09-11-2011	PT 363564032	<i>Anaplasma marginale</i>	Má condição corporal, mucosas pálidas, sem febre	Ivermectina; Imidocarb	Melhorou

	15-10-2011	SEM NÚMERO	<i>Anaplasma marginale</i>	Má condição corporal, mucosas pálidas, sem febre	Oximicina; Ivermectina; Imidocarb	Melhorou
	15-10-2011	SEM NÚMERO	<i>Anaplasma marginale</i>	Má condição corporal, mucosas pálidas, sem febre	Oximicina; Ivermectina; Imidocarb	Melhorou
9	13-10-2011	PT 015446515	<i>Babesia spp.</i> <i>Theileria spp.</i>	Temp rectal 39,8°C, mucosas pálidas, diarreia	Terramicina; ivermectina; imidocarb; vitaminas e ferro	Melhorou
	13-10-2011	PT 215446514	<i>Theileria spp.</i>	Temp rectal 39,8°C; mucosas pálidas	Terramicina; ivermectina; imidocarb; vitaminas e ferro	Melhorou
	13-10-2011	SEM NÚMERO	<i>Babesia spp.</i> <i>Theileria spp.</i>	Temp rectal 40,2°C , mucosas pálidas, diarreia	Terramicina; ivermectina; imidocarb; vitaminas e ferro	Melhorou
	17-12-2011	PT 515219533	<i>Babesia spp.</i>	Má condição corporal, mucosas pálidas, sem febre	Terramicina; ivermectina; imidocarb; vitaminas e ferro	Melhorou
	17-12-2011	PT 414373179	<i>Theileria spp.</i>	Má condição corporal, mucosas pálidas, sem febre	Terramicina; ivermectina; imidocarb; vitaminas e ferro	Melhorou
10	18-01-2012	PT 115404345	<i>Anaplasma marginale</i> <i>Babesia spp.</i>	Má condição corporal, mucosas pálidas, sem febre	Oxitetraciclina; flunixina meglumina; imidocarb; ivermectina; vitaminas; protetores hepáticos	Melhorou
	18-01-2012	PT 663222248	<i>Anaplasma marginale</i> <i>Babesia spp.</i>	Má condição corporal, mucosas pálidas, diarreia, sem febre	Oxitetraciclina; flunixina meglumina; imidocarb; ivermectina; vitaminas; protetores hepáticos	Melhorou
	18-01-2012	PT 315043796	<i>Babesia spp.</i>	Má condição corporal, mucosas pálidas, diarreia, sem febre	Oxitetraciclina; flunixina meglumina; imidocarb; ivermectina; vitaminas; protetores hepáticos	Melhorou
	19-01-2012	PT 86434521	<i>Babesia spp.</i>	Má condição corporal, mucosas pálidas, sem febre	Oxitetraciclina; flunixina meglumina; imidocarb; ivermectina; vitaminas; protetores hepáticos	Melhorou
4	19-12-2011	SEM NÚMERO	<i>Anaplasma marginale</i>	Má condição corporal, mucosas pálidas, sem febre	Oxitetraciclina; Ivermectina; Imidocarb; Ferro	Melhorou
	26-12-2011	SEM NÚMERO	<i>Anaplasma marginale</i>	Má condição corporal, mucosas pálidas, sem febre	Oxitetraciclina; Ivermectina; Imidocarb; Ferro	Melhorou
19	19-10-2011	SEM NÚMERO	<i>Anaplasma marginale</i> <i>e Babesia spp.</i>	Animal caído, magro, com mucosas palidas	Oxitetraciclina; Terramicina; Dexametasona; Imidocarb; Ferro; Fluidoterapia; Vitaminas	Morreu
	19-10-2011	SEM NÚMERO	<i>Anaplasma marginale</i> <i>e Babesia spp.</i>	Animal caído, magro, com mucosas ictéricas	Oxitetraciclina; Terramicina; Dexametasona; Imidocarb; Ferro; Fluidoterapia; Vitaminas	Morreu
20	12-09-2011	SEM NÚMERO	<i>Anaplasma marginale</i>	-	Terramicina; Imidocarb; Ferro; Vitaminas	Melhorou
	03-11-2011	SEM NÚMERO	<i>Anaplasma marginale</i>	-	Terramicina; Imidocarb; Ferro; Vitaminas	Melhorou
	03-11-2011	SEM NÚMERO	<i>Anaplasma marginale</i>	-	Terramicina; Imidocarb; Ferro; Vitaminas	Melhorou
3	18-04-2012	PT 216049368	<i>Babesia spp. e</i> <i>Theileria spp.</i>	Anorexia, temp: 39,9°C; mucosas anémicas	Imidocarb; Ferro; Vitaminas; Protetores Hepáticos	??
14	20-01-2012	SEM NÚMERO	<i>Babesia spp. e</i> <i>Theileria spp.</i>	Animal caído, anorexia, após parto com mucosas ictéricas	Oxitetraciclina; Terramicina; Dexametasona; Imidocarb; Ferro; Fluidoterapia; Vitaminas	Morreu

Tabela 5: Registo de explorações e animais com sintomatologia de “Febre da Carraça”, respetivos resultados, tratamentos implementados e evolução