

CLARISSE MARIA CRAVIDÃO

RELATO DE DOIS CASOS CLÍNICOS DA FASE CRÓNICA DE BESNOITIOSE BOVINA

Presidente: Professora Doutora Laurentina Pedroso

Arguente: Professora Doutora Carla Maia(IHMT)

Vogal: Professor Doutor Daniel Murta

Orientador: Professora Doutora Sofia Van Harten

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade De Medicina Veterinária

Lisboa

2018

CLARISSE MARIA CRAVIDÃO

RELATO DE DOIS CASOS CLÍNICOS DA FASE CRÓNICA DE BESNOITIOSE BOVINA

Dissertação defendida em provas públicas para a obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária do curso de Mestrado Integrado de Medicina Veterinária conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, com o Despacho de Nomeação nº129/2018 com a seguinte composição:

Presidente: Professora Doutora Laurentina Pedroso

Arguente: Professora Doutora Carla Maia(IHMT)

Vogal: Professor Doutor Daniel Murta

Orientador: Professora Doutora Sofia Van Harten

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade De Medicina Veterinária

Lisboa

2018

Aos meus Pais e Irmãos

Agradecimentos

À Minha Família, em especial aos meus Pais, e aos meus Irmãos, um enorme obrigada pelos sacrifícios e pela confiança que sempre depositam em mim e por todos os ensinamentos de vida. Espero que esta etapa, que agora termino, possa, de alguma forma, retribuir e compensar todo o carinho, apoio e dedicação que, constantemente me oferecem. A eles, dedico todo este trabalho.

Ao João Maria, um agradecimento especial pelo apoio e carinho diários, pelas palavras sábias e pela transmissão de confiança e de força, em todos os momentos. Por tudo, a minha eterna gratidão!

Um agradecimento especial à Professora Doutora Sofia Van Harten pela orientação neste projecto. Muito obrigada pelo profissionalismo, pela amizade e pela total disponibilidade que sempre revelou para comigo. O seu apoio foi determinante na elaboração desta Tese.

Ao Professor Doutor Eduardo Marcelino, o meu sincero agradecimento pela coorientação desta tese.

Ao Dr. Pedro Cabral, por ter aceitado ser meu orientador de estágio, pelos conhecimentos transmitidos, pelo espírito prático, pela educação e boa disposição que o caracterizam.

Ao Dr. Luís Filipe Roque, pela sabedoria teórica e prática transmitida, pelas conversas que me fazem hoje ter uma visão mais realista da vida, no que respeita ao trabalho do Médico Veterinário e relação com o produtor.

Ao Dr. Francisco Santa Bárbara e Silva e Dr. António Fonseca, pela confiança, boa disposição e companheirismo, pela persistência e trabalho em equipa e pelos ensinamentos que me transmitiram, aos dois um enorme obrigada.

À Dra. Sara Nóbrega e Dr. Filipa Correia agradecer a amizade e a disponibilidade, bem como, os conhecimentos transmitidos.

À Rita Bizarro e João Grenho, não menos importantes, muito obrigada por tudo o que me ensinaram, pela amizade, alegria, companheirismo e boa disposição que os caracterizam.

Ao Alexandre Lobo e ao Ricardo Poeiras, o meu obrigada por todos os conhecimentos práticos e pelo espírito de equipa fantástico.

No fundo, um agradecimento enorme do fundo do coração à grande Família VETHEAVY, que me acolheu de braços abertos e contribuiu para a concretização deste meu sonho.

A todos os Professores que de alguma forma, durante todo o curso se disponibilizaram para me ajudar.

A todos os amigos que estiveram presentes durante os cinco anos de curso, e que os tornaram numa experiência fantástica e inesquecível.

Resumo

A Besnoitiose bovina, causada pelo Apicomplexa *Besnoitia besnoiti*, é uma doença parasitária reemergente na Europa, que se caracteriza por uma elevada morbilidade e baixa mortalidade nos bovinos. Apresenta uma fase aguda (com febre e anasarca) e uma fase crónica (esclerodermia) associada a consideráveis prejuízos económicos, sobretudo redução da produção de leite e carne, infertilidade nos touros, destruição da pele, abate prematuro e morte. Apesar de nem todos os animais infetados apresentarem sinais clínicos, são considerados portadores assintomáticos da doença através da presença de quistos na pele, no entanto, o aparecimento dos sintomas pode variar dependendo do tempo de infeção e da carga parasitária.

O diagnóstico da doença pode ser concluído de diversas formas, nomeadamente através da serologia, que é um dos meios de eleição a partir da deteção de anticorpos específicos pelo método de imunofluorescência indireta. Também a histopatologia da derme é um exame complementar de diagnóstico muito importante, uma vez que permite detetar a presença de quistos na derme. Ainda não é conhecido nenhum tratamento com resultados satisfatórios em animais infetados, sendo a rastreabilidade da infeção pela colheita de sangue em animais com mais de 6 meses de idade, em simultâneo com a adoção de medidas de prevenção, os únicos meios para o controlo e evitar a disseminação da doença.

A partir do estudo de dois casos clínicos foi possível verificar a fase crónica da doença, em dois bovinos, macho e fêmea, respetivamente com 8 anos de idade de raça Mertolenga e de 14 anos de idade de raça Limousine. Ambos os animais, foram objeto de análises que confirmaram a presença de Besnoitiose bovina, evidenciando sinais crónicos da mesma, procedendo-se, após período de isolamento dos animais ao seu abate por se tratar de reservatórios da doença, temendo-se a disseminação pela manada.

Palavras-chave: Besnoitiose bovina, *Besnoitia besnoiti*, hiperqueratose, esclerodermia.

Abstract

Bovine Besnotitis, caused by Apicomplexa *Besnoitia besnoiti*, is a reemerging parasitic disease in Europe, characterized by high morbidity and low mortality in cattle. It presents an acute phase (with fever and anasarca) and a chronic phase (scleroderma) associated with considerable economic losses, mainly reduction of milk and meat production, infertility in the bulls, skin destruction, premature death and death. Although not all infected animals show clinical signs, they are considered asymptomatic carriers of the disease through the presence of cysts in the skin, however, the appearance of symptoms may vary depending on the time of infection and the parasite load.

Diagnosis of the disease can be completed in a variety of ways, including through serology, which is one of the means of choice from the detection of specific antibodies by the indirect immunofluorescence method. Also the histopathology of the dermis is a very important complementary diagnostic examination, since it allows detecting the presence of cysts in the dermis. No treatment with satisfactory results in infected animals is yet known, with the traceability of infection by blood collection in animals older than 6 months of age, together with the adoption of preventive measures, the only means of control and dissemination of the disease.

From the study of two clinical cases, it was possible to verify the chronic phase of the disease in two male and female cattle, respectively 8 years of age Mertolenga and 14 years of age of Limousine breed. Both animals were the subject of analyses that confirmed the presence of Besnoitiose, evidencing chronic signs of it, after a period of isolation of the animals to their slaughter because they are reservoirs of the disease, fearing the spread by the herd.

Key words: Bovine Besnoitiosis, *Besnoitia besnoiti*, hyperkeratosis, scleroderma.

Lista de Abreviaturas e Siglas

BVD - Vírus da diarreia bovina

CE - Corpo Estranho

DGAV – Direção Geral de Alimentação e Veterinária

DG - Diagnóstico de gestação

EV - Endovenoso

Fi - Frequência absoluta

Fr - Frequência relativa

HE - Hematoxilina-Eosina

IBR – Rinotraqueíte infecciosa bovina (Infectious Bovine Rhinotracheitis)

IV – Intravenoso

INIAV – Instituto Nacional de Investigação Agrária Veterinária

IM - Intramuscular

IFAT - Teste de Imunofluorescência Indireta (Imunofluorescent Antibody Test)

IFI – Imunofluorescência Indireta

ITS - Internal Transcribed Spacer 1

LEB – Leucose Enzoótica Bovina

rDNA – Ribossomal DNA

RT – PCR - Reverse transcription polymerase chain reaction

SC - Subcutâneo

TPM - Teste de pré-movimentação animal

TRC - Tempo de reflexão capilar

Índice

Introdução	12
CAPÍTULO I – Relatório de Casuística	13
1.1 Introdução	13
1.1.1 Animais observados por espécie e por área clínica	13
1.1.1.1 Sanidade ou medicina preventiva.....	15
1.1.1.2 Vacinação	15
1.1.1.3 Desparasitação.....	17
1.1.1.4 Rastreio Anual.....	18
1.1.1.5 Testes de Pré-Movimentação Animal	19
1.1.1.6 Reprodução.....	20
1.1.1.7 Identificação de Animais.....	21
1.1.1.8 Clínica Médica	22
CAPÍTULO II- Monografia: Besnoitiose Bovina	24
2.1 Introdução	24
2.2 Revisão bibliográfica.....	26
2.2.1 <i>Besnoitia Besnoiti</i> : Morfologia e Ciclo de Vida.....	26
2.2.2 Epidemiologia	27
2.2.3 Distribuição geográfica da Besnoitiose Bovina.....	28
2.2.4 Distribuição geográfica da Besnoitiose Bovina na Europa.....	28
2.2.5 Transmissão	29
2.2.5.1 Hipótese da transmissão direta	29
2.2.5.2 Hipótese da transmissão indireta.....	30
2.2.5.3 Primeiros ensaios de infeção experimental	31
2.2.6 Factores de Risco	32
2.2.6.1 Sazonalidade.....	32
2.2.6.2 Raça.....	32
2.2.6.3 Idade	32
2.2.7 Sinais Clínicos	33
2.2.7.1 Fase Aguda.....	33
2.2.7.2. Fase Crónica.....	35
2.2.7.3 Achados anatomopatológicos.....	36
2.2.8 Diagnóstico da infeção por <i>Besnoitia besnoiti</i>	36
2.2.8.1 Diagnóstico Clínico.....	36
2.2.8.2 Diagnóstico Laboratorial.....	37

2.2.9 Tratamento	38
2.2.10 Vacinação.....	39
2.2.11 Prevenção	39
2.2.11.1 Explorações sem animais infetados.....	40
2.2.11.2 Primeiros casos clínicos	40
2.2.11.3 Medidas a médio e longo prazo.....	40
CAPÍTULO III - Relato de Casos	42
2.2.12 Caso Clínico 1.....	42
2.2.12.1 Sinais clínicos:.....	42
2.2.12.2 Diagnósticos Diferenciais na fase crónica:	43
2.2.12.3 Exames complementares realizados.....	43
2.2.12.4 Resultados	44
2.2.12.5 Tratamento	46
2.2.13 Caso Clínico 2.....	47
2.2.13.1 Sinais Clínicos:.....	48
2.2.13.2 Diagnósticos Diferenciais na fase crónica:	48
2.2.13.3 Resultados	49
2.2.13.4 Tratamento	50
CAPÍTULO IV – Discussão	52
CAPÍTULO V – Conclusão.....	54
Referências Bibliográficas.....	55
ANEXOS	60
Anexo 1	61

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Animais observados por espécie	13
Tabela 2 - Animais observados por área clínica.....	14
Tabela 3 - Distribuição dos casos acompanhados na sanidade.....	15
Tabela 4 - Distribuição dos casos acompanhados na vacinação.....	17
Tabela 5 - Distribuição dos casos acompanhados de desparasitação	18
Tabela 6 - Distribuição dos casos acompanhados de rastreio anual	19
Tabela 7 - Distribuição dos casos acompanhados em TPM	19
Tabela 8 - Distribuição dos casos acompanhados em reprodução	20
Tabela 9 - Distribuição dos casos acompanhados em identificação de animais.....	21
Tabela 10 - Distribuição dos casos acompanhados em clínica médica	23
Tabela 11 - Cronologia do aparecimento dos sinais clínicos da fase aguda e da fase crónica..	35

Índice de Gráficos

Gráfico 1 - Distribuição dos casos acompanhados por Espécie	14
Gráfico 2 - Distribuição dos casos acompanhados por Área Clínica	14

Índice de Ilustrações

Ilustração 1 - Quisto de <i>Besnoitia besnoiti</i>	12
Ilustração 2 - Ciclo de vida e transmissão de <i>B.besnoiti</i> num bovino.	27
Ilustração 3 - Hipóteses da transmissão direta e indireta de <i>B.besnoiti</i>	29
Ilustração 4 - Espessamento /Pregueamento da pele..	42
Ilustração 5 - Alopecia dos membros posteriores..	43
Ilustração 6 - Biópsia de pele para histopatologia com utilização de punch de 8mm. .	44
Ilustração 7 - Resultados obtidos pelo Teste de Imunofluorescência Indireta (IFI).	45
Ilustração 8 - Aspeto microscópico das lesões cutâneas características da fase crónica de besnoitiose bovina..	45
Ilustração 9 - Aspeto macroscópico das lesões cutâneas nas regiões da cabeça e pescoço..	47
Ilustração 10 - Biópsia de pele em zona afetada, com punch descartável de 8mm..	49
Ilustração 11 - Resultados obtidos pelo Teste de Imunofluorescência Indireta (IFI).. .	49
Ilustração 12 - Resultado obtido pela biópsia de pele.....	50
Ilustração 13 - Ponto de aplicação no crânio da arma de estilete/projétil.....	51

Introdução

O presente relatório refere-se ao estágio de natureza curricular, parte complementar do mestrado integrado em Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.

Neste sentido, elegeu-se como área a clínica de animais de pecuária, com o intuito de diversificar e ampliar o mais possível os conhecimentos e competências que se pretendeu adquirir com a realização deste estágio.

Deste modo, a sua realização teve como objetivo principal integrar e consolidar os conhecimentos obtidos na fase curricular do curso e, adquirir e melhorar competências no contexto da prática clínica na área de diagnóstico, terapêutica profilaxia, urgências e cirurgia. Por outro lado, durante este estágio, na Vetheavy foram recolhidos os dados necessários para a realização deste relatório.

Assim, a elaboração deste relatório de estágio tem como finalidade caracterizar e descrever as atividades desenvolvidas e competências adquiridas com a sua realização.

Este relata as atividades desenvolvidas durante os seis meses de estágio no período compreendido entre 3 de Outubro de 2016 a 31 de Março de 2017, sob orientação dos seis médicos veterinários que integram a equipa e o restante corpo clínico da Vetheavy, Serviços de Sanidade e Reprodução animal.

O relatório decompõe-se em 3 partes:

Relatório de casuística: Que dá conta de uma breve sumarização, tratamento estatístico e apresentação dos casos observados bem como os procedimentos acompanhados durante o decorrer do estágio.

Monografia: Que assenta sobre o tema “Besnoitiose bovina”

Relato de caso: Descrição/relato de dois casos acompanhados na clínica, sobre o tema da monografia e respetiva discussão.

A escolha do tema Besnoitiose bovina consagrou-se devido ao facto de ter acompanhado durante o estágio curricular inúmeros casos onde este foi o diagnóstico final e por se tratar de uma doença reemergente na Europa com bastante incidência no Alentejo. Atualmente muito diagnosticada na clínica de animais de grande porte e o interesse em aprofundar mais tema foi crucial na escolha.

CAPÍTULO I – Relatório de Casuística

1.1 Introdução

O relatório de casuística pretende apresentar de forma breve e sumarizada todos os casos clínicos acompanhados durante o período de estágio na Vetheavy. Desta forma, este capítulo será organizado por quatro áreas distintas: Sanidade ou Medicina Preventiva, Clínica Médica, Reprodução e Identificação Animal.

Nos gráficos que se seguem, será apresentada a distribuição dos casos observados por espécie animal e posteriormente por área clínica.

Cada tabela irá mostrar a frequência absoluta (F_i) e a frequência relativa (F_r %), primeiramente das áreas clínicas de forma geral e em segundo lugar dos procedimentos realizados dentro de cada uma das áreas referidas.

1.1.1 Animais observados por espécie e por área clínica

Foi possível verificar que ao nível da distribuição dos casos observados por espécie houve uma predominância da espécie ovina (55%), seguida da espécie bovina (44%) (**Tabela 1**). As restantes espécies (caprinos, suínos e equinos) representaram 1% dos animais observados (**Gráfico 1**). O número total de animais foi cerca de 23 370, porém este número não corresponde ao número integral de animais individualmente, uma vez que é muito frequente em clínica existir mais do que um procedimento a realizar em cada animal. Ex1: Vacinação e desparasitação; Ex2: Vacinação com Rispoval 4 e Covexin10.

Tabela 1 - Animais observados por espécie

Espécies observadas	Animais intervencionados
Bovinos	10227
Ovinos	12948
Restantes Espécies	195
Total	23370

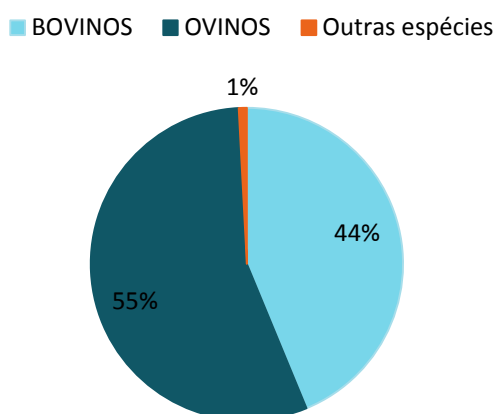


Gráfico 1 - Distribuição dos casos acompanhados por espécie

Em relação à distribuição dos casos observados por área clínica é possível concluir, a partir do **Gráfico 2 e Tabela 2**, que a área com maior afluência é sem margem para dúvidas a sanidade ou medicina preventiva 87%, posteriormente a reprodução com 7% dos casos, a identificação de animais 5%, e por fim a clínica médica, ou urgências 1%.

Tabela 2 - Animais observados por área clínica

Áreas clínicas de maior incidência	Nº de animais intervencionados
Clínica médica	245
Identificação de animais	1566
Reprodução	2276
Sanidade ou medicina preventiva	26970
Total	31057

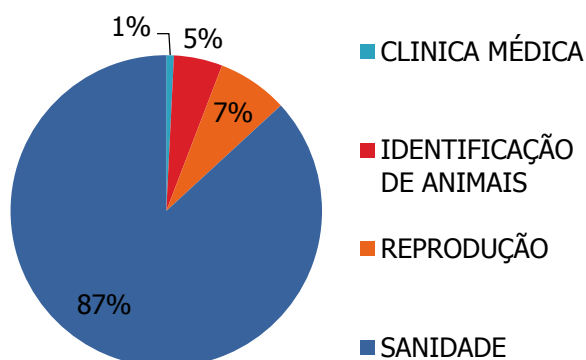


Gráfico 2 - Distribuição dos casos acompanhados por área clínica

1.1.1.1 Sanidade ou medicina preventiva

A sanidade em animais de pecuária é de enorme importância, uma vez que zela pela prevenção e erradicação de doenças, tanto de zoonoses, como de doenças infecciosas e parasitárias que possam por em causa a qualidade e bem-estar do efetivo e população em geral. Dela fazem parte a vacinação, desparasitação, o rastreio de algumas doenças de declaração obrigatória como tuberculose, leucose, brucelose e os testes de pré-movimentação animal. Em análise da **Tabela 3**, observe-se que a vacinação e desparasitação (64,36%) foram o procedimento mais efetuado aos animais, seguido do rastreio anual (29,52%) e Teste de pré-movimentação animal (TPM) - 6,11%.

Tabela 3- Distribuição dos casos acompanhados na sanidade

	Bovinos	Ovinos	Caprinos	Fi	Fr (%)
Vacinação e Desparasitação	8644	8967	90	17701	64,36
Rastreio Anual	7025	1094	0	8119	29,52
TPM	1681	0	0	1681	6,11
Total	17350	10061	90	27501	100,00

Legenda: Fi – Frequência absoluta; Fr – Frequência Relativa; TPM - Teste de pré-movimentação animal

A vacinação caracteriza-se pela administração de uma vacina. Esta não é mais do que uma substância derivada ou quimicamente semelhante a um agente infeccioso particular, causador de doença. Essa substância é posteriormente reconhecida pelo sistema imunitário de um indivíduo vacinado desencadeando uma resposta que o protege de uma doença associada ao agente. Essa imunização tem como finalidade prevenir ou atenuar os efeitos de uma eventual infeção causada por esse agente patogénico.

No decorrer do estágio, uma grande percentagem de animais por efetivo foi vacinada, desenvolvendo-se assim imunidade de grupo, que assume uma função primordial no controlo de doenças e zoonoses. As vacinas utilizadas com maior frequência durante o estágio foram:

- a (Rispoval 4)^R em bovinos (27,72%), que protege os animais contra o vírus da diarreia bovina (BVD) e o vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), parainfluenza (PI3) e vírus respiratório sincicial bovino (BRSV),
- a (Covexin 10)^R, também em bovinos (27,71%) que assegura a protecção dos animais contra clostridioses (10 estirpes),
- a (Covexin 8)^R em Ovinos (26,88%) que garante a imunização ativa contra clostridioses (8 estirpes),
- a (Syvazul)^R em Ovinos (6,32%), que previne a virémia e reduz os sinais clínicos e lesões causadas pelo serótipo 1 do vírus da Língua azul,
- (Heptavac P Plus)^R em ovinos (4,51%) que garante a imunização ativa das ovelhas contra clostridioses,
- e (Ovilis Enzovax)^R em ovinos (2,62%) para imunização activa das reprodutoras suscetíveis, como ajuda na prevenção do aborto e partos prematuros devidos a *Clamydophila abortus*.

As vacinas menos usadas, mas não menos importantes foram:

- a (Spirovac L5)^R em bovinos (0,92%), vacina que previne doenças causadas pela *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo-bovis,
- a (Coxevac)^R em caprinos com (0,52%), para controlo da Febre Q causada por *Coxiella burnetti*,
- e por último a (Leptavoid H)^R em bovinos com (0,09%) que é uma vacina inativada contra a leptospirose bovina (**Tabela 4**).

Tabela 4 - Distribuição dos casos acompanhados na vacinação

	Bovinos	Ovinos	Caprinos	Fi	Fr (%)
(Covexin 10) ^R	4820			4820	27,71
(Covexin 8) ^R	200	4476		4676	26,88
(Bravoxin 10) ^R	400			400	2,30
(IBR Rispoval 4) ^R	4822			4822	27,72
(Bovilis IBR/BVD) ^R	40			40	0,23
(Rispoval Pasteurella) ^R	30			30	0,17
(Ovilis Enzovax) ^R		456		456	2,62
(Syvazul) ^R		1100		1100	6,32
(Heptavac P Plus) ^R	144	640		784	4,51
(Leptavoid H) ^R	15			15	0,09
(Spirovac L5) ^R	160			160	0,92
(Coxevac) ^R			90	90	0,52
Total	10631	6672	90	17393	100,00

Legenda: Fi – Frequência absoluta; Fr – Frequência Relativa

1.1.1.3 Desparasitação

As parasitoses constituem um problema sanitário sério nas explorações pecuárias devido aos prejuízos associados. O fato de não apresentarem sinais clínicos alarmantes, promovendo, em muitos casos, somente prostração e fragilidade do efetivo, pode conduzir à redução da produção dos animais, tanto adultos como jovens. Os parasitas distinguem-se comumente em endoparasitas e ectoparasitas. Os endoparasitas mais importantes são os gastrointestinais pertencentes à classe dos nemátodes e a contaminação ocorre devido à ingestão de larvas existentes nos pastos contaminados, onde alguns fatores predisponentes são o excesso de humidade, animais jovens em contacto com animais adultos e a sobrelotação dos pastos. Os parasitas externos são aqueles que invadem a pele ou o pelo dos animais. Estes podem causar irritação da pele, mas também provocar doenças. Os mais encontrados são os artrópodes pertencentes à ordem Ixodida como as carrças, Siphonaptera como as pulgas e Phthiraptera como os piolhos. Durante o estágio, o desparasitante mais utilizado em bovinos foi Virbamec (Ivermetina 10mg) em 23,92% dos casos, estando indicado no tratamento e controlo de endoparasitas como nemátodes gastrointestinais, filárias cutâneas, nomeadamente a *Parafilaria bovicola* e parasitas pulmonares como *Dictyocaulus viviparus*, mas também, de ectoparasitas, particularmente larvas de

moscas, pilhos, ácaros e carraças dos bovinos tropicais. Em segundo lugar, o mais utilizado foi Virbamec F, representando 15,89% dos casos (Ivermectina 10mg + Closulon 100mg/ml), que para além do tratamento e controlo já referido, este contempla o controlo da Fasciolose por *Fasciola hepática*. Por último, a administração de Ivomec, Ivermectina Merial a 1 %, representou apenas 8,56% dos casos, sendo frequentemente usado no tratamento e controlo dos principais parasitas internos e externos dos bovinos. Em ovinos o desparasitante mais utilizado foi Seponver Plus – suspensão oral (Closantel 50mg + Mebendazol 75mg) em 44,50% dos casos, este desparasitante está indicado no tratamento e controlo de trematódes e nemátodes gastrointestinais e pulmonares, assim como no tratamento de céstodes e alguns artrópodes. Outros também foram administrados, mas com menor frequência sendo exemplos: Animec super (3,42%), Ivertin (3,16%) e Clormec (0,55%) (**Tabela 5**).

Tabela 5 - Distribuição dos casos acompanhados de desparasitação

	Bovinos	Ovinos	Fi	Fr (%)
Virbamec	3024		3024	23,92
Virbamec f	2009		2009	15,89
Ivomec	482	600	1082	8,56
Animec Super		432	432	3,42
Seponver plus		5626	5626	44,50
Ivertin		400	400	3,16
Clormec	70		70	0,55
Total	5585	7058	12643	100,00

Legenda: Fi – Frequência absoluta; Fr – Frequência Relativa

1.1.1.4 Rastreio Anual

A Organização Mundial da Saúde Animal (OIE), é uma organização intergovernamental que tem como principal objetivo coordenar e incentivar a elaboração de normas sanitárias para o controlo das epizootias. Esta possui uma lista de doenças de declaração obrigatória que são consideradas zoonoses perigosas. Algumas delas estão apresentadas na **Tabela 6**, e após análise, a maioria dos casos (42,55%) pertencem a bovinos e ovinos com o rastreio anual para brucelose, seguidos de 36,82% para tuberculose em bovinos e por último o rastreio para a Leucose Enzoótica Bovina

(LEB), representando 20,63% dos casos. Como resultado das medidas sanitárias aplicadas, a situação epidemiológica do país foi evoluindo favoravelmente, e no que respeita à LEB, na publicação da Decisão da Comissão 2012/204/EU de 19 de Abril de 2012, os distritos das Regiões de Lisboa e Vale do Tejo, do Centro e do Norte – exceto a Divisão de Intervenção Veterinária (DIV) do Porto, foram consideradas oficialmente indemnes LEB. No entanto, de forma a manter este estatuto, será necessário continuar a implementação de medidas de vigilância. Neste sentido, deverá obedecer-se aos requisitos estipulados na Diretiva do Conselho 64/432/CEE de 26 de Junho de 1964 para que “Todos os animais com idade superior a 24 meses sejam serologicamente controlados uma vez durante os primeiros cinco anos, após a região ter obtido o estatuto oficialmente indemne”. Direcção - Geral de Alimentação Veterinária (DGAV, 2012)

Tabela 6 – Distribuição dos casos acompanhados de rastreio anual

	Bovinos	Ovinos	Fi	Fr (%)
Brucelose	7025	1094	8119	42,55
Leucose Enzoótica Bovina	3936		3936	20,63
Tuberculose	7025		7025	36,82
Total	17986	1094	19080	100,00

Legenda: Fi – Frequência absoluta; Fr – Frequência Relativa

1.1.1.5 Testes de Pré-Movimentação Animal

Os testes de pré-movimentação animal são testes obrigatórios para brucelose e tuberculose efetuados aos bovinos com mais de 12 meses de idade, nos 30 dias anteriores à sua movimentação. Os animais só poderão sair da exploração após a obtenção de resultados negativos nos testes de diagnóstico e respetiva colocação da informação nos passaportes. Durante o estágio acompanhei TPM de 1681 bovinos (100%) (**Tabela 7**).

Tabela 7 - Distribuição dos casos acompanhados em TPM

	Bovinos	Fi	Fr (%)
TPM	1681	1681	100,00
Total	1681	1681	100,00

Legenda: Fi – Frequência absoluta; Fr – Frequência Relativa; TPM - testes de pré-movimentação

1.1.1.6 Reprodução

A reprodução é uma especialidade da área da medicina veterinária que nos últimos tempos tem assumido um papel muito importante, não só para os médicos veterinários, como e, principalmente para os produtores que hoje lhe conferem maior importância. O fator económico tem sido uma das principais causas para o seu crescimento, pois com a alteração do sistema de quotas pagas ao produtor por vacas aleitantes, os produtores começaram a preocupar-se cada vez mais em saber quais os animais dentro do efetivo que se encontram gestantes e qual o intervalo entre partos dos mesmos, de forma a conseguir uma produtividade maior e mais equilibrada, promovendo maior sustentabilidade da pecuária.

Da reprodução fazem parte alguns exames complementares de diagnóstico, que em análise da **Tabela 8** se podem verificar. O diagnóstico de gestação por palpação transretal, bem como ecografia transretal ocupou 86,38 % dos casos observados. Com 10,37 % seguiram-se os exames andrológicos a touros e carneiros, de forma a avaliar a integridade e qualidade reprodutiva dos mesmos, seguindo-se o diagnóstico através de kit rápido visual de gestação (IDEXX) que ocupou 3,87%. IDEXX é um teste rápido de deteção da gestação. Trata-se de um imunoensaio que permite a detetar se um animal está gestante a partir de sangue total (EDTA) ou soro. Em último lugar, 3,25% dos casos foram ocupados pela sincronização deaios em bovinos através da aplicação de prostaglandinas (PGF_{2α}), nomeadamente cloprostenol, que é um análogo sintético da PGF_{2α}, sob a forma injetável e buserelina, um análogo sintético da hormona hipotalâmica de gonadotrofina (GnRH).

Tabela 8 - Distribuição dos casos acompanhados em reprodução

	Bovinos	Ovinos	Fi	Fr (%)
DG com Kit rápido	88		88	3,87
DG por ecografia transretal	514	1452	1966	86,38
Sincronização de cio	74	0	74	3,25
Exames andrológicos	51	185	236	10,37
Total	639	1637	2276	100,00

Legenda: DG- Diagnóstico de Gestação; Fi - Frequência absoluta; Fr - Frequência relativa

1.1.1.7 Identificação de Animais

De acordo com o Regulamento (CE) n.º 1560/2007 do Conselho, a identificação eletrónica de ovinos passou a ser obrigatória para os animais nascidos a partir de 31 de Dezembro de 2009. Sendo o principal objetivo da identificação eletrónica a rastreabilidade, isto é, a capacidade de detetar a origem e de seguir o rasto de um animal ao longo de todas as fases da produção, transformação e distribuição. As regras referentes à identificação dos animais das espécies ovina e caprina são fixas pelo Despacho n.º 6635/2011, que pode ser encontrado no **Anexo 1**. Este Despacho determina que os ovinos e caprinos, no território nacional, para além da marca auricular convencional, devem ser identificados com um bolo reticular. Os designados “kits eletrónicos” que são constituídos por um brinco convencional, de cor salmão ou verde na parte macho e amarelo na parte fêmea (aplicados no pavilhão auricular esquerdo) e bolo reticular com o mesmo código do brinco convencional. Os animais deverão ser identificados com estes “kits eletrónicos” até aos 9 meses após o nascimento. Este procedimento alcançou 79,89% dos casos (**Tabela 9**).

Em caso de perda ou ilegibilidade da marca auricular convencional são utilizados os denominados meios de identificação de substituição (brincos SIA de cor vermelha e cor-de-laranja que têm por objetivo reidentificar o animal, fazendo uma associação do novo brinco com o bolo reticular em 20,11% dos casos (**Tabela 9**).

Por outro lado, embora não tenha realizado tal procedimento, a identificação de animais em bovinos consiste na colocação de marcas auriculares oficiais aplicadas em cada orelha com o mesmo número de identificação, antes dos 20 dias após o nascimento.

Tabela 9 - Distribuição dos casos acompanhados em identificação de animais

	Ovinos	Fi	Fr (%)
Kits electrónicos	1251	1251	79,89
Identificação de substituição	315	315	20,11
Total	1566	1566	100,00

Legenda: Fi – Frequência absoluta; Fr – Frequência Relativa

1.1.1.8 Clínica Médica

A clínica médica consiste num conjunto de especialidades médicas, com as quais o veterinário se depara em urgência no seu dia-a-dia. Dentro da clínica médica, os casos acompanhados durante o estágio com maior frequência pertencem às áreas da reprodução, neonatologia e obstetrícia, mais concretamente, com 25,25% dos casos, seguindo-se as doenças parasitárias com 22,73 % e a gastroenterologia com 15,15 % como se verifica na **Tabela 10**.

Na área da reprodução, neonatologia e obstetrícia foram acompanhados 48 casos em bovinos, dos quais 17 foram partos, 4 cesarianas, 4 casos de prolapso uterino, 6 fetotomias, 5 retenções placentárias, 1 caso de piómetra, 1 mamite e 9 casos de vaca caída pós-parto por lesão do nervo obturador. Foi também observado um touro de raça Alentejana cujos sinais clínicos foram determinantes no diagnóstico final de postite. As doenças reprodutivas são muito frequentes na clínica de campo e a maior parte delas surge devido ao parto, ou com fatores relacionados ao parto. A retenção placentária após o parto é um fator muito predisponente no desencadeamento de metrite e/ou piómetra; já o prolapso uterino, bem como as lesões do nervo obturador são também uma consequência do esforço da mãe no momento do parto. Em ovinos, observou-se apenas um caso de fetotomia.

Quanto às doenças infeto-contagiosas bacterianas e parasitárias, presenciaram-se 45 casos. Em ovinos foram observados 25 casos de peea, causadas pelas bactérias *Fusobacterium necrophorum* e *Dichelobacter nodosus*. **Quinze doenças parasitárias em bovinos** originadas pelo parasita *Besnoitia besnoiti*, doença designadas de Besnoitiose bovina e três casos de anaplasmoze causada pelo *Anaplasma marginale* e uma rickettsia intra-eritrocitária, transmitida por insetos hematófagos, que comumente se diagnostica pela observação de sinais clínicos e pela deteção do microrganismo no sangue ou anticorpos no soro. A gastroenterologia representou uma frequência relativa de 15,15%, verificando-se 4 doenças diferentes, sendo a mais prevalente a diarreia neonatal que corresponde a 15 casos. Foram também acompanhados 6 casos de indigestão em bovinos, 1 caso de cólica intestinal em equino e 2 casos de timpanismo gasoso em bovinos.

No campo dos abscessos, feridas e corpos estranhos, a actinomicose foi a doença que mais se observou em bovinos, representando 5 casos. Esta patologia infeto-

contagiosa provocada pela bactéria *Actinomyces bovis*, acomete principalmente ruminantes, podendo ser transmitidas aos humanos e caracteriza-se pela presença de lesão granulomatosa e supurativa localizada na maxila ou na mandíbula. Em equinos foram acompanhados 3 casos de feridas de origem traumática nos membros e um caso de abcesso de casco no membro anterior direito.

A medicina dentária em equinos ou dentisteria é uma área da medicina veterinária com pouca expressão em Portugal, apesar da grande relevância que representa para a saúde e bem-estar do cavalo. A saúde oral influencia tanto a condição corporal como a performance desportiva do animal. Nesta área assistiu-se à consulta de 4 cavalos, todos do sexo masculino, com idades compreendidas entre 1 e 18 anos e pertencentes à raça Lusitana.

Por fim, foi concedida a oportunidade de assistir e colaborar na realização de 29 necropsias, das quais 23 em bovinos, 3 em ovinos, uma em caprinos, 2 em suínos e ainda 7 eutanásias em bovinos.

Tabela 10 - Distribuição dos casos acompanhados em clínica médica

	Bovinos	Ovinos	Equinos	Caprinos	Suínos	Fi	FR (%)
Reprodução, Neonatologia, Obstetrícia	49	1				50	25,25
Infeções, Feridas, CE, Abscessos	6		4			10	5,05
Oftalmologia	16					16	8,08
Pneumologia	6		1			7	3,54
Gastroenterologia	30					30	15,15
Doenças Parasitárias e Bacterianas	18	25			2	45	22,73
Dentisteria			4			4	2,02
Necropsia	23	3		1	2	29	14,65
Eutanásia	7					7	3,54
Total	155	29	9	1	4	198	100,00

Legenda: Fi – Frequência absoluta; Fr – Frequência Relativa

CAPÍTULO II- Monografia: Besnoitiose Bovina

2.1 Introdução

A Besnoitiose bovina foi reconhecida como doença por Cadéac, em França, em 1884, sendo-lhe atribuída a designação de elefantíase ou anasarca dos bovinos (Cádeac 1884). Em 1912, confirmou-se a sua etiologia parasitária, com a identificação de grandes e numerosos quistos de bradizoítos na derme de bovinos (Besnoit & Robin 1912). Nesta altura, a doença foi denominada de sarcosporidiose cutânea. Mais tarde surgiram trabalhos sobre a sua distribuição noutras regiões, nomeadamente em Portugal, sendo a descrição portuguesa a primeira a considerar as implicações económicas da Besnoitiose bovina na produção animal. (Franco & Borges 1915).

Em 1915, Enrico Franco e Ildefonso Borges publicaram um extenso trabalho que resumia 30 anos de investigação sobre a Besnoitiose bovina (Franco & Borges, 1915). Neste trabalho foram descritas importantes observações sobre a doença em Portugal, as suas manifestações clínicas, o quisto parasitário e a reação do hospedeiro à presença do quisto na pele, denominado por “tecido de reação peri-quístico” (**Ilustração 1**). Franco e Borges propuseram, igualmente, a inclusão deste parasita num novo género, *Besnoitia*, denominando-se assim o parasita por *Besnoitia besnoiti* (*B. besnoiti*) (Marotel, 1912)

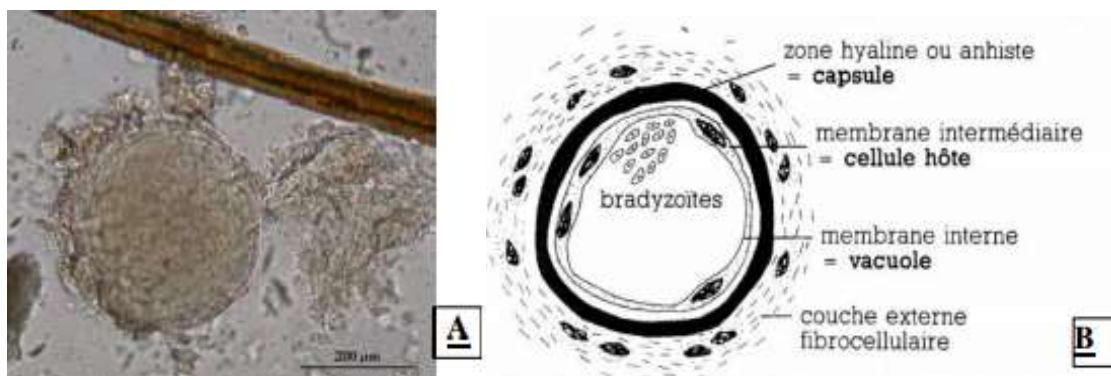


Ilustração 1 - Quisto de *Besnoitia besnoiti*. A: Quistos com bradizoítos observados a partir de uma amostra cutânea de uma animal em fase de esclerodermia (x100); B: Esquema de um quisto de *B. besnoiti* (Fouquet, 2009).

Besnoitia besnoiti é o parasita intracelular obrigatório responsável pela Besnoitiose bovina. É um protozoário Apicomplexa pertencente ao grupo das coccídeas formadoras de quistos que apresenta semelhanças morfológicas e genéticas com os géneros *Toxoplasma*, *Neospora* e *Sarcocystis* (Diesing *et al.*, 1988; Jacquet *et al.*, 2010).

Muitas são as espécies animais que são experimentalmente suscetíveis à infeção, nomeadamente gerbilos (Shkap *et al.*, 2002), ratos (Schaes *et al.*, 2009), coelhos, ovelhas e cabras (Pols 1960) no entanto, os bovinos, e possivelmente algumas espécies de antílopes, são os únicos hospedeiros naturais conhecidos (Ellis *et al.*, 2000; Jacquet *et al.*, 2010).

Segundo Bigalke (1968) apenas foi possível confirmar o estabelecimento de infeções subclínicas através de tabanídeos, glossinas e moscas de estábulo. Apesar disso, a transmissão mecânica através de insetos hematófagos tem sido sugerida com base na localização cutânea dos quistos e na maior incidência da doença nos meses de verão, quando os artrópodes são mais ativos.

Este parasita pode afetar todas as raças e idades podendo levar a substanciais perdas económicas como resultado da redução da produção de leite e de carne, infertilidade nos touros, destruição da pele, abate prematuro e morte.

Os sinais clínicos podem ocorrer na fase aguda, sendo exemplos, febre, anorexia, descargas nasais e oculares, taquicardia, taquipneia, salivação, edema subcutâneo e orquites, ou durante a fase crónica da infeção manifestando-se em espessamento e endurecimento da pele, hiperqueratose, alopecia e visualização macroscópica de quistos nos tecidos da conjuntiva escleral e mucosa genital (Bigalke, 1968). Contudo, segundo Fernandez *et al.*, (2009) e Jacquet, *et al.*, (2010) estima-se que menos de 1/3 dos animais infetados desenvolvam sinais clínicos. Assim, animais subclínicos infetados são considerados epidemiologicamente importantes, apesar de passarem despercebidos no rebanho, podem constituir uma fonte de infeção.

A inexistência de tratamento e de vacinas seguras e eficazes, o desconhecimento do seu ciclo de vida, bem como a baixa consciencialização de médicos veterinários (MV) e produtores para esta doença, dificultam a implementação de estratégias de prevenção e controlo (Cortes *et al.*, 2007; Shkap *et al.*, 1987).

2.2 Revisão bibliográfica

2.2.1 *Besnoitia Besnoiti*: Ciclo de Vida

Besnoitia besnoiti é classificada de acordo com Eckert *et al.* (1992), no reino animal, sub-reino Protozoa, filo Apicomplexa, classe Sporozoea, subclasse Coccidia e ordem Eucoccidiida, pertencendo à família Toxoplasmatidae, tal como acontece com os géneros *Toxoplasma*, *Neospora* e *Hammondia*, responsáveis por graves morbilidades no homem e em muitas espécies de animais domésticos e silvestres. Segundo Authority European Food Safety (2010), o género *Besnoitia* compreendia nove espécies (*B. besnoiti*, *B. benetti*, *B. jellisoni*, *B. wallacei*, *B. tarandii*, *B. darling*, *B. caprae*, *B. akadoni*, *B. oryctofeli*). Nesse ano, Dubey e Yabsley (2010), num trabalho desenvolvido a partir de Southern Plains Woodrat (*Neotoma micropus*), um roedor existente no México e Estados Unidos da América, descreveram uma nova espécie do género *Besnoitia*, *B. neotomofelis* tendo demonstrado que o hospedeiro definitivo é o gato.

Suspeita-se que tanto *B. besnoiti*, como outras coccídeas formadoras de quistos, tenham um ciclo de vida indireto (**Ilustração 2**), sendo os carnívoros considerados hospedeiros definitivos, e gado e bovinos selvagens (ex: antílopes) representam os hospedeiros intermediários. No entanto, o ciclo completo de *B. besnoiti* continua desconhecido, e o seu hospedeiro definitivo permanece por identificar. (Diesing *et al.*, 1988 e Rommel 1975) citado por Basso *et al.* (2011).

De todas as espécies de *Besnoitia*, apenas os ciclos de vida de *B. darlingi*, *B. wallacei*, *B. oryctofelisi* e *B. neotomofelis* são conhecidos, sendo o gato o seu hospedeiro definitivo (Dubey *et al.*, 2003; Dubey e Yabsley, 2010; Smith e Frenkel, 1977) citado por Basso *et al.* (2011). Para as restantes espécies de *Besnoitia*, *B. bennetti*, *B. jellisoni*, *B. caprae*, *B. tarandi* e *B. akodoni*, incluindo *B. besnoiti* o hospedeiro definitivo mantém-se desconhecido (Dubey *et al.*, 2003) citado por Basso *et al.* (2011).

Passado mais de um século após o reconhecimento dos primeiros casos clínicos, muito pouco se sabe sobre o modo de transmissão da doença (Cádeac 1884). Peteshev *et al.* (1974), tendo alimentado gatos com tecidos de bovinos infetados com *B. besnoiti* e encontrado oocistos nas fezes, sugeriram serem o gato doméstico (*Felis catus*) e o gato selvagem africano (*Felis libyca*) os hospedeiros definitivos de *B. besnoiti*. Contudo, dada a não repetibilidade destes resultados e a dúvida sobre o estado higio-sanitário dos

gatos utilizados, permanece o desconhecimento sobre o hospedeiro definitivo de *B. besnoiti*.

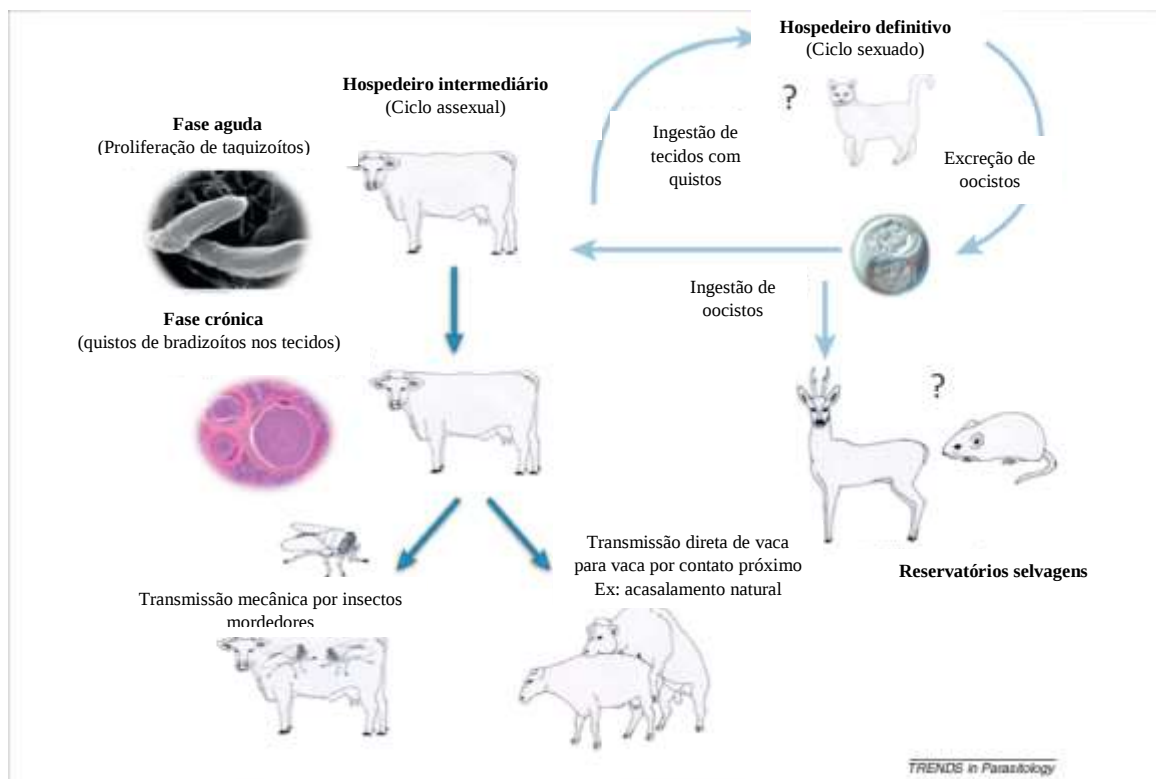


Ilustração 2 - Ciclo de vida e transmissão de *B. besnoiti* num bovino. Fonte: **Alvarez et al. (2013)**

2.2.2 Epidemiologia

Bigalke (1960) e Marsh *et al.* (1998) descrevem que a altura do ano onde ocorrem a maioria dos casos de Besnoitiose é nos meses de verão, o que por ser a altura em que as temperaturas estão mais altas, e consequente maior densidade populacional de insetos hematófagos, parece evidenciar a importância dos vetores mecânicos na propagação de Besnoitia entre os bovinos (Pols, 1960).

Bigalke (1960) demonstrou através de trabalhos experimentais, esta possibilidade para *Glossina brevipalpis*, *Tabanus dentricornis*, *T. taenicola*, *Stomoxys* spp., *Siphona* e *Haematobia* (Bigalke, 1968) permanecendo, no entanto, desconhecido se outros artrópodes o podem veicular, nomeadamente alguns membros da família *Ixodidae*.

A transmissão iatrogénica do parasita pela utilização de agulhas hipodérmicas está igualmente comprovada e é também de extrema importância epidemiológica, nomeadamente aquando da aplicação de protocolos de vacinação e desparasitação, bem como da tuberculinização, no decurso de ações de luta contra as zoonoses (Bigalke, 1968).

2.2.3 Distribuição geográfica da Besnoitiose Bovina

Apesar de a sua etiologia ter sido estabelecida pela primeira vez na Europa (Besnoit e Robin, 1912), foi em África, no Médio Oriente e na Ásia, as regiões onde a Besnoitiose bovina foi considerada **prevalente** durante várias décadas (Pols 1960). A primeira referência de Besnoitiose bovina no continente africano surgiu em 1941 (Hofmeyr, 1945). Várias comunicações pessoais surgem na bibliografia, onde se assinala a ocorrência da doença na África do Sul, na Nigéria e no Sudão. Nas antigas Províncias Ultramarinas Portuguesas são conhecidos vários trabalhos (Ferreira *et al.*, 1982; Ferreira & Dias, 1984; Ferreira, 1985) na sequência da observação de casos de Besnoitiose bovina em Moçambique. Da Ásia surgiram, igualmente, comunicações científicas que referem a doença no Kazaquistão. No Médio Oriente são conhecidos casos de Besnoitiose bovina em Israel, distribuindo-se por todo o país, o que despoletou a investigação da doença e do seu agente por Shkap *et al.* (1995).

2.2.4 Distribuição geográfica da Besnoitiose Bovina na Europa

Em Portugal, as primeiras descrições datam de 1885 (Franco e Borges, 1915), reaparecendo novamente em 1949 (Leitão 1949), onde é referido o aparecimento desta doença nos matadouros e as consequentes reprovações totais daí resultantes. No entanto, após um longo período sem registo de novos casos, a Besnoitiose bovina foi novamente diagnosticada no final da década de 80, no Alentejo, numa clínica de campo, situada em Montemor-o-Novo por Malta e Silva (1991). Desde aí, foram identificados inúmeros novos casos da doença nesta região, onde até ao momento parece estar circunscrita, alastrando por explorações onde não há registos anteriores de animais com os característicos sinais clínicos (Caeiro *et al.*, 2001).

Noutros países da Europa verificou-se um padrão de expansão e aumento de igual incidência, o que motivou a sua classificação como doença emergente pela Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA, 2010).

2.2.5 Transmissão

Em condições naturais, o modo da transmissão da Besnoitiose bovina é desconhecido. A transmissão através de um vetor mecânico artrópode ou de um vetor biológico tem sido frequentemente implicada como o mecanismo mais provável. No entanto, não existe evidência suficiente para rejeitar outras hipóteses de transmissão, quer diretas, quer indiretas (**Ilustração 3**).

2.2.5.1 Hipótese da transmissão direta

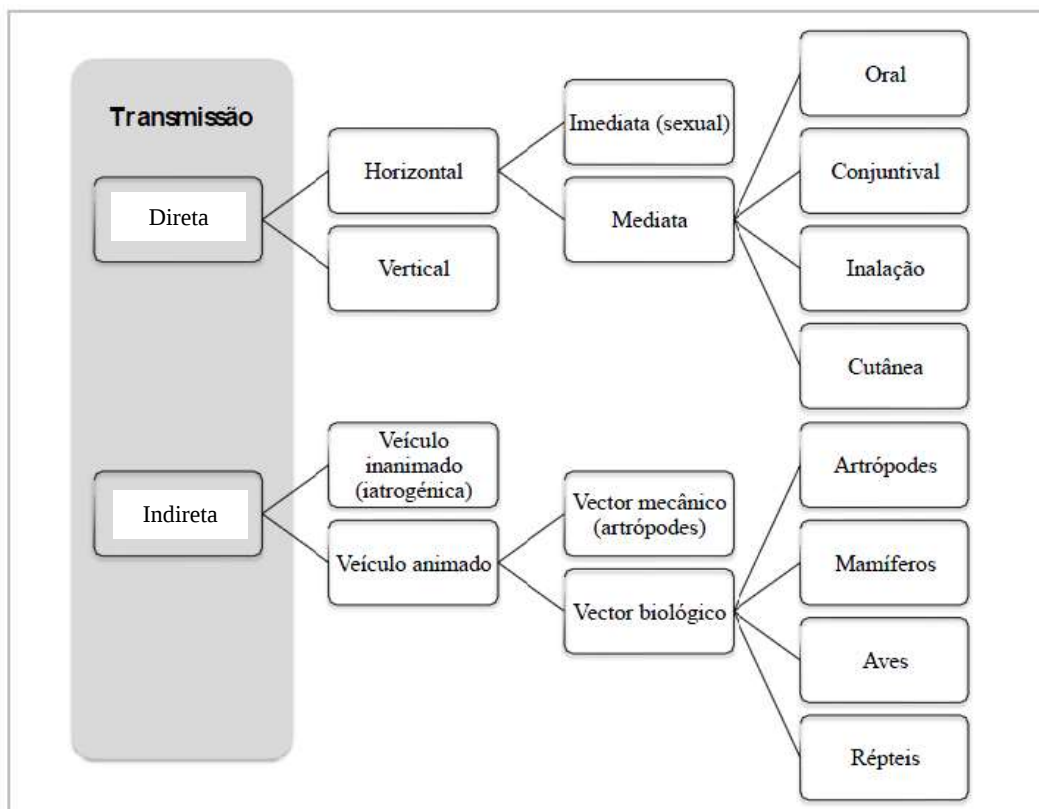


Ilustração 3 - Hipóteses da transmissão direta e indireta de *B.besnoiti*. Fonte: (H. M. Waap 2015).

A transmissão direta, caracteriza-se por um mecanismo de transferência entre os animais infetados e suscetíveis, na ausência de um veículo ou vetor e que pressupõe que o agente causador da doença seja transmitido por contágio. Esta forma de transmissão pode dar-se por via horizontal, de maneira imediata ou mediata, ou verticalmente, de mãe para filho, por via transplacentária ou durante o parto. Na transmissão imediata, existe contacto físico entre a fonte primária de infeção e o novo hospedeiro, por exemplo, no caso das doenças sexualmente transmissíveis. O mecanismo de transmissão é mediato, quando os agentes patogénicos são transferidos para os animais suscetíveis através do contacto com as secreções ou excreções dos animais infetados, por via oral, fecal-oral, conjuntival, cutânea ou por inalação. No âmbito da Besnoitiose bovina, a transmissão por contacto físico é pouco provável, especialmente devido ao seu carácter sazonal. A exposição das formas infetantes contidas nos quistos, embora seja possível por rotura espontânea dos quistos ou através de soluções de continuidade da pele ou mucosas, não parece ser suficiente para justificar a elevada prevalência frequentemente encontrada nas explorações. A transmissão por via sexual tem sido rejeitada por vários autores, por não ter sido nunca demonstrada e em particular porque a doença também ocorre em explorações que utilizam a inseminação artificial.

2.2.5.2 Hipótese da transmissão indireta

A transmissão indireta implica a transferência dos agentes patogénicos para os hospedeiros suscetíveis, acontecendo por meio de um veículo animado ou inanimado. Para que esta forma de transmissão seja possível, é fundamental que os agentes consigam sobreviver fora do organismo do hospedeiro durante um determinado período de tempo e que o veículo seja capaz de assegurar a sobrevivência do agente. A transmissão por meio de um veículo animado pode ocorrer através de um vetor artrópode, biológico ou mecânico, ou ser mediada por um ciclo de vida integrando hospedeiros intermediários e definitivos, vertebrados e/ou invertebrados. A transmissão através de um veículo inanimado, denomina-se transmissão iatrogénica, resultando do próprio ato médico, que ocorre frequentemente através da reutilização de agulhas contaminadas.

Para testar a hipótese de transmissão indireta de *B. besnoiti* foram realizados inúmeros estudos de infecção experimental por via entérica e parentérica, utilizando os estádios conhecidos do parasita, os taquizoítos e bradizoítos.

2.2.5.3 Primeiros ensaios de infecção experimental

Os primeiros ensaios de infecção experimental realizados na tentativa de transmitir a doença através parasitas cutâneos, foram conduzidos por Besnoit e Robin, 1912 que tentaram transmitir *B. besnoiti* aos animais, injetando quistos por via subcutânea, mas sem sucesso (Pols 1960).

Franco e Borges (1916) falharam, quando repetiram o mesmo trabalho em ratos, administrando quistos infetados por via oral e subcutânea (Pols 1960).

Cullié e Chelle & Berlureau (1936) levaram a cabo o que aparentemente seria uma transmissão bem-sucedida da doença, administrando uma suspensão do quisto por via intravenosa num touro que desenvolveu febre 15 dias depois. No entanto, omitiram os exames relativos às seções cutâneas realizadas posteriormente, o que não permitiu concluir o sucesso na transmissão de infecção.

Mais tarde, em 1953, Pols (1960) reproduziu os trabalhos de Cullié *et al.* (1936), usando amostras de pele de gado fortemente parasitadas. As amostras foram suspensas numa solução salina e posteriormente misturadas num liquidificador, revelando a presença de inúmeros esporos móveis. Foi então administrado, sob a forma de uma suspensão opaca, o inóculo em dois touros por via intravenosa e por via subcutânea noutros dois recetores na proporção 5ml/50kg PV, tendo sido também implantando no flanco de um bovino, uma amostra de tecido conjuntivo infetado com quistos de *B. besnoiti*. Foram registadas as temperaturas corporais dos cinco recetores, duas vezes ao dia, durante um período de dois meses, seguindo-se uma inspeção visual de mais dois meses. Em nenhum momento foi detetada qualquer evidência clínica de Besnoitiose bovina. Tal como Cullié e Chelle (1936), Pols (1960) omitiu ter examinado secções de pele para detetar quistos parasitados, e, portanto, não se concluiu se ocorreu ou não uma infecção subclínica.

2.2.6 Factores de Risco

2.2.6.1 Sazonalidade

Na África do Sul a maioria dos novos casos ocorre nos meses de maior calor e humidade (Bilgake, 1981). Com base em observações limitadas de dois surtos na Europa, verificou-se que o surgimento dos sinais clínicos coincide com o verão, altura em que as **manadas** compartilham as pastagens (Alzieu, 2007; Fernandez *et al.*, (2009) e quando os artrópodes estão mais ativos. Os métodos de manejo tradicionais, como a transumância, ou seja, o pastoreio conjunto de animais de diferentes explorações, nos períodos de maior atividade dos vetores, podem contribuir para a disseminação da doença.

2.2.6.2 Raça

Todas as raças de bovinos são suscetíveis ao aparecimento de ***B. besnoiti***. No sul de África a maioria dos casos ocorre no *Bos indicus*, que é a espécie bovina mais comum da região endémica (R. Bilgake 1981). A infeção foi descrita tanto em bovinos de leite como em bovinos de carne e nas mais variadas raças.

2.2.6.3 Idade

Bigalke (1981) relatou que existe uma relação entre a idade do animal e a epidemiologia da doença. Neste relato, o aumento estatisticamente significativo na seroprevalência e morbilidade, evidenciada pelos sinais clínicos típicos, foi associada à idade. A elevada incidência da infeção foi detetada em animais adultos de uma exploração onde a doença estava presente, no entanto, raramente foi detetada em animais com menos de seis meses de idade. A incidência da doença é muito baixa nos animais com menos de um ano e praticamente ausente nos vitelos antes do desmame. Apenas Bigalke e Schoeman (1967), citados por Bigalke (1968), diagnosticaram a infeção em dois animais com 4 meses de idade. A transferência passiva de anticorpos através do colostro das mães para os filhos poderá contribuir para explicar este fenómeno (Shkap *et al.*, 1994). Contrastando com a maior seroprevalência nos animais mais velhos, na África do Sul, Bigalke (1968) observou que a incidência clínica da doença era mais elevada nos animais com 3-6 anos.

2.2.6.4 Movimento animal

Os bovinos na fase crónica, ao albergar um enorme número de quistos, são considerados um reservatório e uma fonte de infeção. Um dos fatores de risco mais importantes para a manifestação da Besnoitiose bovina parece ser a introdução de animais infetados na exploração. Os primeiros casos reportados na Alemanha (Mehlhorn *et al.*, 2009), Itália (Agosti *et al.*, 1994), Suíça (Lesser *et al.*, 2012), Hungria (Hornok *et al.*, 2014) e Croácia (Beck, 2013) foram associados à importação de animais com infeções subclínicas de França. Bigalke (1968) referiu que a introdução de apenas alguns animais infetados numa exploração indemne, era suficiente para causar a disseminação da infeção. Nos surtos de Besnoitiose bovina, verificou-se que em menos de três anos o parasita se propaga praticamente a todo o efetivo (Fernandez-Garcia *et al.*, 2010; Rostaher *et al.*, 2010). Por outro lado, os animais negativos introduzidos numa exploração infetada podem desenvolver doença grave e fatal e servir de multiplicadores do parasita (Cortes *et al.*, 2005). A doença é raramente encontrada nas explorações vizinhas, possivelmente devido ao curto tempo de sobrevivência do parasita no vetor e porque a distância é um fator limitante para a transmissão através de artrópodes (Bigalke, 1968).

2.2.7 Sinais Clínicos

Os sinais típicos de Besnoitiose bovina manifestam-se em duas fases distintas: a fase aguda de anasarca associada à proliferação dos endozoítos de *B. besnoiti* e a fase crónica de esclerodermia, associada à formação de quistos. As infeções inaparentes, acompanhadas apenas de ligeira hipertermia e diminuição do apetite, representam a maioria dos casos no campo.

2.2.7.1 Fase Aguda

A febre é o primeiro sinal clínico. A temperatura rectal pode atingir 40-42°C e manter-se durante 2 a 10 dias, estando associada à multiplicação dos taquizoítos. As manifestações clínicas da doença são geralmente precedidas de um período de incubação curto, de 6-10 dias. Bigalke (1968) referiu um período de incubação médio de 13 dias após infeção experimental com insetos hematófagos.

Basson, *et al.* (1970) observaram que durante esta fase, as alterações degenerativas e necróticas provocadas por *B. besnoiti*, são as mais frequentes, seguindo-se vasculite e trombose, em especial nas pequenas e médias veias, como também em algumas artérias. Estas alterações são responsáveis pelos edemas, alterações degenerativas e mesmo enfarte, com maior incidência nos testículos e pele. A piréxia faz-se acompanhar de inapetência progressiva, com anorexia completa nos casos mais graves e consequente perda de peso. Os animais apresentam relutância ao movimento, dando preferência ao decúbito. Na fase aguda, os animais apresentam fotofobia, corrimento nasal, epífora, paragem de ruminação e aumento da frequência cardíaca bem como respiratória, podendo também ocorrer abortos. A existência de sinais inespecíficos torna o diagnóstico difícil, podendo a doença ser confundida com doença respiratória bovina, febre catarral maligna, erlichiose, babesiose, fotossensibilidade aguda e insuficiência cardíaca, devido à acumulação de líquidos nos membros e regiões ventrais (Bigalke & Prozesky, 2004; Alzieu *et al.*, 2007). Poucos dias depois do aumento da temperatura, especialmente nos animais de pelagem clara, observa-se hiperémia do focinho, pele periorbital e escroto. Os edemas surgem com a progressão da doença, podendo sofrer variações, desde a ligeira tumefação do focinho, espessamento das pregas de pele do pescoço, dorso e tórax, até ao edema generalizado (anasarca). A pele dos animais encontra-se quente, espessa e dolorosa à palpação. Nas fêmeas observa-se congestão do úbere e tetos e nos machos, orquites dolorosas, acompanhadas de infertilidade transitória ou definitiva. Os animais podem sucumbir nesta fase. Os sinais agudos passam muitas vezes despercebidos no campo. A transição para a cronicidade pode acontecer de forma abrupta, com o desaparecimento dos sinais agudos por volta da terceira semana (**Tabela 11**).

Tabela 11- Cronologia do aparecimento dos sinais clínicos da fase aguda e da fase crónica.
Fonte: Bilgake, 1981.

Fase	Sinais clínicos	Dias pós-infecção
Aguda	Pirexia	3
	Inapetência	3
	Polipneia	3
	Hiperémia do focinho	4
	Astenia dos quartos posteriores	6
	Anasarca	7
	Temperatura normal	14
	Necrose da pele	21
	Desaparecimento da anasarca	23
Crónica	Alopécia	25
	Esclerodermia	25-35
	Linfadenopatia	29
	Quistos visíveis na conjuntiva da esclera	36

2.2.7.2. Fase Crónica

A fase crónica corresponde à fase de formação de quistos, preferencialmente no tecido conjuntivo, sobretudo na derme, trato respiratório superior, vasos sanguíneos, aponevroses e periósteo. Estes quistos começam a ser visíveis na conjuntiva da esclera, mucosa nasal e vulvar, 6-7 semanas após a subida inicial da temperatura e os sinais clínicos mais evidentes são o espessamento e pregueamento progressivo da pele. Três a quatro semanas após o início da febre, os animais podem desenvolver um inchaço marcado das pernas, o que torna o movimento difícil e doloroso. A doença evolui com alopecia progressiva, dermatite com hiperqueratose, formação de crostas e fissuras profundas entre as pregas de pele. As lesões cutâneas podem ser confundidas com sarna sarcóptica, pediculose, dermatofilose, paraqueratose e fotossensibilidade e intoxicação por mercúrio. (Bigalke e Prozesky, 2004; Álvarez-García *et al.*, 2013). Nos casos graves observa-se corrimento nasal mucopurulento com formação de crostas nas narinas e dificuldade respiratória. Os animais apresentam geralmente linfadenopatia superficial, hipertermia ligeira, que se prolonga durante várias semanas, anorexia e emaciação,

podendo levar à morte do animal. Na fase crónica, a infertilidade nos machos é geralmente definitiva, devido a orquite severa, com necrose, calcificação e atrofia testicular uni ou bilateral, tornando-se aspermatogénicos. Nas formas severas, a esclerodermia e alopecia persistem, embora se verifique uma melhoria gradual da aparência dos animais (Waap, et al. 2015).

2.2.7.3 Achados anatomopatológicos

À dissecação, a parede das veias do tecido subcutâneo contém pequenos focos hemorrágicos e a íntima das veias e artérias não se apresenta regular e está coberta de material rosado acinzentado a avermelhado, apresentando-se as veias e artérias de grande calibre com aspeto normal. Nestes animais, é frequente encontrar rinite, com petéquias disseminadas pelas fossas nasais (Basson *et al.*, 1965). Os linfonodos encontram-se congestionados, edematosos e hemorrágicos, surgindo também áreas localizadas de degeneração muscular e necrose principalmente nos músculos dos membros, sendo possível encontrarem-se áreas bem delimitadas, de cor rosa pálida ou bege por todo o corpo. Os pulmões e a traqueia encontram-se congestionados e edematosos, apresentando algumas petéquias disseminadas de forma irregular por todo o tecido pulmonar. Nestes animais podem-se encontrar pequenas áreas hemorrágicas nos mais diversos tecidos, predominantemente no coração, rim, glândulas adrenais, abomaso, laringe e faringe (Basson, McCully, & Bigalke, 1970).

2.2.8 Diagnóstico da infeção por *Besnoitia besnoiti*

2.2.8.1 Diagnóstico Clínico

O diagnóstico clínico na fase inicial da doença não é fácil, dado que os principais sinais clínicos, como febre e dispneia, são pouco específicos. É por isso de extrema importância conhecer o historial da exploração, bem como a área geográfica onde esta se inclui. A ocorrência de Besnoitiose na área pode alertar-nos para a sua inclusão na lista de potenciais diagnósticos diferenciais. Quando o processo evolui para a fase crónica e as lesões cutâneas se tornam evidentes, torna-se mais fácil o diagnóstico definitivo.

É essencial o diagnóstico laboratorial para descartar qualquer outro tipo de afeção. Deste modo, o diagnóstico serológico é um dos meios de eleição, através da detecção de anticorpos específicos pelo método de imunofluorescência indireta, que se caracteriza por ser um teste de elevada sensibilidade e especificidade. A histopatologia da derme é outro exame complementar de diagnóstico muito importante, que nos permite detectar a presença de quistos na derme.

É importante referir que nem todos os animais infetados apresentam sinais clínicos. Apesar de infetados, os animais poderão nunca manifestar doença, o que não lhes retira importância epidemiológica, uma vez que podem ser portadores de quistos na pele.

2.2.8.2 Diagnóstico Laboratorial

2.2.8.2.1 Diagnóstico Serológico

A detecção de anticorpos específicos constitui um importante meio de diagnóstico da infeção por *B. besnoiti*. A prova serológica mais utilizada no diagnóstico de infeção é o teste de imunofluorescência indireta (IFI) (Goldman e Pipano 1983; Shkap *et al.*, 2002). A IFI, caracterizando-se por sensibilidade e especificidade elevadas (Shkap *et al.*, 2002), é frequentemente sugerida como prova serológica de referência (Shkap *et al.*, 1984). O antigénio mais utilizado é constituído por taquizoítos inteiros de *B. besnoiti* provenientes de culturas *in vitro*.

2.2.8.2.2 Diagnóstico Histopatológico

Reconhecido o tropismo de *B. besnoiti* para a derme, é igualmente este o órgão de eleição para o diagnóstico da doença. Em situações de Besnoitiose bovina no estado crónico, é muito elevado o número de quistos de *B. besnoiti* presentes na pele. A observação de cortes histopatológicos ao microscópio ótico, permite distinguir com facilidade os quistos dos de outros géneros de Apicomplexa que infetam bovinos. Essa constatação levou a que desde as primeiras observações se recorresse à histopatologia de biópsias de pele como forma de diagnóstico da doença. Contudo, nas formas sub-

clínicas o diagnóstico histopatológico poderá ter limitações. Para estes casos, Cortes *et al.*, (2007) desenvolveram um método mais sensível para o diagnóstico da infecção, recorrendo à amplificação das sequências ITS1 rDNA por RT-PCR a partir de biópsias de pele.

2.2.9 Tratamento

Os primeiros ensaios clínicos em animais de laboratório foram levados a cabo por Pols (1960) em coelhos. As substâncias testadas incluíram a pentamidina, a aureomicina, a formalina, o iodeto de sódio, a sulfamerazina, a micostatina e a oxitetraciclina, mas nenhum destes compostos mostrou ser eficaz nas doses utilizadas. Shkap, de Waal e Potgieter (1985) observaram que a administração de oxitetraciclina, no momento da infecção, numa dose de 30 mg/kg IM, prevenia o desenvolvimento de orquite em coelhos, embora todos os animais manifestassem uma reação febril transitória. Os autores concluíram que a oxitetraciclina apresentava potencial terapêutico no combate da infecção e que os coelhos eram um modelo adequado para os ensaios terapêuticos. Em trabalhos posteriores, Shkap *et al.* (1984) avaliaram também a eficácia das sulfamidas, da pirimetamina, do trimetoprim, da halofunginona, da oxitetraciclina, do aceturato de diminazeno e da pentamidina *in vivo*, em gerbilos (*Meriones tristami shawii*) e *in vitro*, em células Vero infetadas com *B. besnoiti*. Destes compostos, apenas a oxitetraciclina de longa ação mostrou ser eficaz, conferindo proteção completa aos animais, com uma administração única de 200 mg/kg. Nos ensaios *in vitro*, a oxitetraciclina não mostrou qualquer ação sobre as formas intracelulares. Em estudos mais recentes, Cortes *et al.* (2007) demonstraram que a nitazoxanida (agente antiparasitário de largo espectro eficaz contra protozoários como *Cryptosporidium parvum* e *Giardia lamblia*) e uma série de seus derivados, inibiam a proliferação dos taquizoítos de *B. besnoiti in vitro*, em células Vero, induzindo a vacuolização do citoplasma do parasita e a desintegração da membrana do vacúolo parasitóforo. Noutro estudo *in vitro*, demonstrou-se que as arilimidamidas, uma nova classe de diamidinas aromáticas, apresentam uma ação marcada sobre os taquizoítos de *B. besnoiti* cultivados em células Vero (Cortes *et al.*, 2011). No campo, Jacquet (2010) recomendou as sulfamidas para diminuir a gravidade dos sinais clínicos (sulfadimerazina, 200 mg/kg ou sulfadimetoxina, 80 mg/kg, durante pelo menos 7 dias),

referindo, contudo, que o tratamento não era curativo e que os relapsos eram frequentes. A falta de eficácia do tratamento na fase crónica, deve-se provavelmente à dificuldade das drogas penetrarem nos quistos revisto por Alvarez *et al.* (2013). No caso de se justificar, poderá instituir-se uma terapêutica de suporte à base de antibióticos de largo espectro para combater as infeções secundárias, corticóides e anti-inflamatórios não esteróides, para diminuir a inflamação perivascular gerada pela multiplicação dos parasitas nas células dos vasos sanguíneos, e diuréticos, para diminuir os edemas.

2.2.10 Vacinação

Vacinas vivas atenuadas à base de taquizoítos produzidos em cultura de células foram desenvolvidas na África do Sul e em Israel. A vacina utilizada na África do Sul foi preparada com um isolado de gnu (Bigalke *et al.* 1974) e a de Israel com isolado bovino (Pipano, 1997).

Na África do Sul, a administração de uma dose única de vacina mostrou ser eficaz na prevenção da doença clínica por um período de quatro anos. No entanto, a vacina não previne a infeção subclínica dos animais (Bigalke e Prozesky, 2004).

Para além de não existirem dados de segurança e eficácia suficientes, o uso de vacinas vivas atenuadas tem o inconveniente de poder introduzir artificialmente o parasita nas explorações indemnes, com o risco da sua disseminação através de animais portadores. Isto é especialmente importante no caso de *B. besnoiti*, uma vez que o seu ciclo de vida e modo de transmissão ainda é desconhecido.

2.2.11 Prevenção

Os elevados prejuízos económicos e a impossibilidade de tratar ou vacinar os animais, fazem com que a prevenção seja o elemento fundamental de forma a evitar que a doença entre na exploração. Nos casos em que a infeção já estiver instalada, é crucial limitar a sua disseminação e tentar eliminá-la a médio ou longo prazo.

2.2.11.1 Explorações sem animais infectados

Nas explorações onde os animais ainda não são portadores da doença, em especial nas zonas indemnes, recomenda-se uma análise de risco para todos os animais importados (presença da infeção na exploração/país/região de origem). Em caso de dúvida, é importante isolar os animais recém-adquiridos, examinando alguns parâmetros como a conjuntiva da esclera para detetar eventuais quistos e proceder ao despiste serológico da infeção (Ferrié, 1984).

2.2.11.2 Primeiros casos clínicos

Com o aparecimento dos primeiros casos clínicos, no diagnóstico é essencial perceber se a infeção foi importada há pouco tempo ou se, pelo contrário, os casos clínicos resultam de uma evolução insidiosa da doença na exploração. Os animais afetados devem ser imediatamente isolados, para evitar a contaminação da restante manada. Por sua vez, se os animais com sinais clínicos tiverem sido adquiridos recentemente, é recomendável eliminá-los logo que possível.

No caso de se optar pela terapêutica de suporte, é preciso ter em consideração que os animais tratados, mesmo que aparentemente curados, permanecem portadores e são fonte de infeção para os outros animais. A manada deve ser examinada diariamente, para identificar os animais doentes no início do período febril. Uma vez que a estratégia de luta contra a doença depende da prevalência da infeção dentro da exploração, é importante proceder o mais rapidamente possível ao rastreio serológico dos animais. As medidas instituídas devem ser complementadas com a aplicação de produtos inseticidas para limitar a propagação da doença através de vetores mecânicos, uma vez que se admite que possam participar na transmissão (Ferrié, 1984; Jacqieut *et al.*, 2010; Alvarez-García *et al.*, 2013).

2.2.11.3 Medidas a médio e longo prazo

A rastreabilidade da infeção nas explorações passa essencialmente pela colheita de sangue a todos os animais com mais de 6 meses de idade, para análise serológica. No caso de prevalências baixas, é recomendável eliminar todos os animais positivos, mas por outro lado, esta medida não é praticável se a prevalência for elevada. Deste modo, deve-se tentar eliminar a doença gradualmente, adotando várias medidas de prevenção

em simultâneo. Estas incluem o refugio dos animais doentes, a separação dos animais em lotes serologicamente positivos e negativos, evitando a proximidade dos diferentes lotes, sobretudo nos meses de primavera e verão e a separação dos animais entre explorações vizinhas. As situações de prevalência intermédia terão que ser analisadas caso a caso. Ao longo do tempo, poderá ser útil identificar os parques e zonas de pasto com uma maior concentração de insetos e por isso mais propícias à propagação da doença, evitando que os animais vão para estes locais nos períodos de maior infestação. É também aconselhável impedir que os animais permaneçam repetidamente nos mesmos locais, uma vez que a acumulação de fezes atrai os insetos. Evitar a concentração dos partos no verão poderá trazer algum benefício, dado que as fêmeas no final da gestação se encontram num estado de imunodepressão fisiológica, o que as poderá tornar mais sensíveis à infeção, numa altura que coincide com uma maior atividade dos insetos. Sempre que possível, recomenda-se o aumento do número de novilhas de reposição, uma vez que os lotes de animais jovens são os mais afetados, sendo necessário fazer um refugio maior. A aplicação regular de produtos inseticidas parece ter um papel importante no controlo da transmissão através de insetos hematófagos (Ferrié, 1984; Jacqieut *et al.*, 2010; Alvarez-García *et al.*, 2013).

CAPÍTULO III - Relato de Casos

2.2.12 Caso Clínico 1

Em Março de 2017, foi atendido um bovino macho com oito anos de idade, de raça Mertolenga, numa propriedade situada no Alentejo, mais concretamente no distrito de Évora, apresentando alopecia generalizada pelo corpo, com maior incidência na cabeça, pescoço e membros e espessamento da pele, apatia, anorexia e relutância ao movimento. O proprietário refere o aparecimento dos sintomas há cerca de 1 mês e meio, que têm vindo a piorar consideravelmente.

Ao exame físico os sinais clínicos evidenciaram diagnóstico compatível com a fase crónica de Besnoitiose bovina (**Ilustração 4 e 5**).

2.2.12.1 Sinais clínicos:

- Apatia;
- Perda de peso;
- Anorexia;
- Espessamento/pregueamento da pele;
- Alopecia generalizada com maior incidência na cabeça e nos membros posteriores;
- Relutância ao movimento.



Ilustração 4 – Espessamento/Pregueamento da pele. Fonte: Autor.

A frequência cardíaca e respiratória encontrava-se dentro dos parâmetros considerados normais, bem como uma temperatura corporal normal (38,3°C). 7



2.2.12.2 Diagnósticos Diferenciais na fase crónica:

- Sarna sarcóptica;
- Pediculose;
- Dermatofilose;
- Paraqueratose;
- Fotossensibilidade;
- Intoxicação por mercúrio.

Ilustração 5 – Alopécia dos membros posteriores. Fonte: Autor.

2.2.12.3 Exames complementares realizados

Por forma a descartar as doenças acima citadas fez-se colheita de sangue para pesquisa de anticorpos anti-Besnoitia *besnoiti*, pelo método de imunofluorescência indireta (IFI), e procedeu-se à biopsia de pele para pesquisa de quistos na derme.

O fragmento de pele foi obtido através da utilização de biótomo de 8 mm, também designado por “punch” (**Ilustração 6**). Depois de se proceder à contenção do animal em manga apropriada, procedeu-se à tricotomia de uma área de pele lesionada com cerca de 4 cm² localizada na tábua do pescoço. Não foi efetuado nenhum método de assepsia nesta fase. Realizou-se anestesia local subcutânea com injeção de 1ml de lidocaína a 2%, com agulha de 20 g. Após cinco minutos, foi aplicado o biótomo sobre a pele fazendo ligeira pressão e rodando continuamente numa única direção até a lâmina estar totalmente inserida na espessura da pele. O fragmento foi removido com o auxílio de tesoura e de pinça bico de pato. A amostra foi colocada em frasco com formaldeído a 3,7%, em quantidade superior a dez vezes o volume da peça. A sutura da pele foi realizada através de ponto simples com fio de seda 3/0 e procedeu-se à aplicação tópica de solução de iodopovidona e repelente de insetos.



Ilustração 6 - Biópsia de pele para histopatologia com utilização de punch de 8mm
Fonte: Autor.

As amostras recolhidas foram enviadas posteriormente para o Instituto Nacional de Investigação Agrária Veterinária (INIAV) para a realização do diagnóstico serológico e da histopatologia da derme.

2.2.12.4 Resultados

O resultado obtido pelo teste de imunofluorescência indireta (IFI), foi positivo, apresentando anticorpos específicos para *B. besnoiti* (**Ilustração 7**). O resultado obtido a partir da biópsia de pele revelou-se igualmente positivo, como se pode verificar na **Ilustração 8**, as lesões cutâneas características da fase crónica de *B. besnoiti*, com a presença de quistos junto à epiderme. Perante este resultado, confirmou-se a suspeita inicial de Besnoitiose bovina, descartando assim todos os outros diagnósticos diferenciais atrás referidos.



Boletim de Análises

N.º de Análise: **PAT-17-21387**

EXAMES

Laboratório de Parasitologia <> Av. da República, Quinta do Marquês 2780-157 Oeiras
Exame(s) pretendido(s): **Parasitológico - Pesquisa Besnoitia**

Exame: ****Pesquisa de anticorpos anti-Besnoitia besnoiti por Imunofluorescência indirecta**

Técnico Responsável: **[Redacted]**

Cod.: **300 pt**

Resultado:

PT314544558 -

Positivo (++)

Ilustração 7 - Resultados obtidos pelo Teste de Imunofluorescência Indireta (IFI). Fonte: INIAV

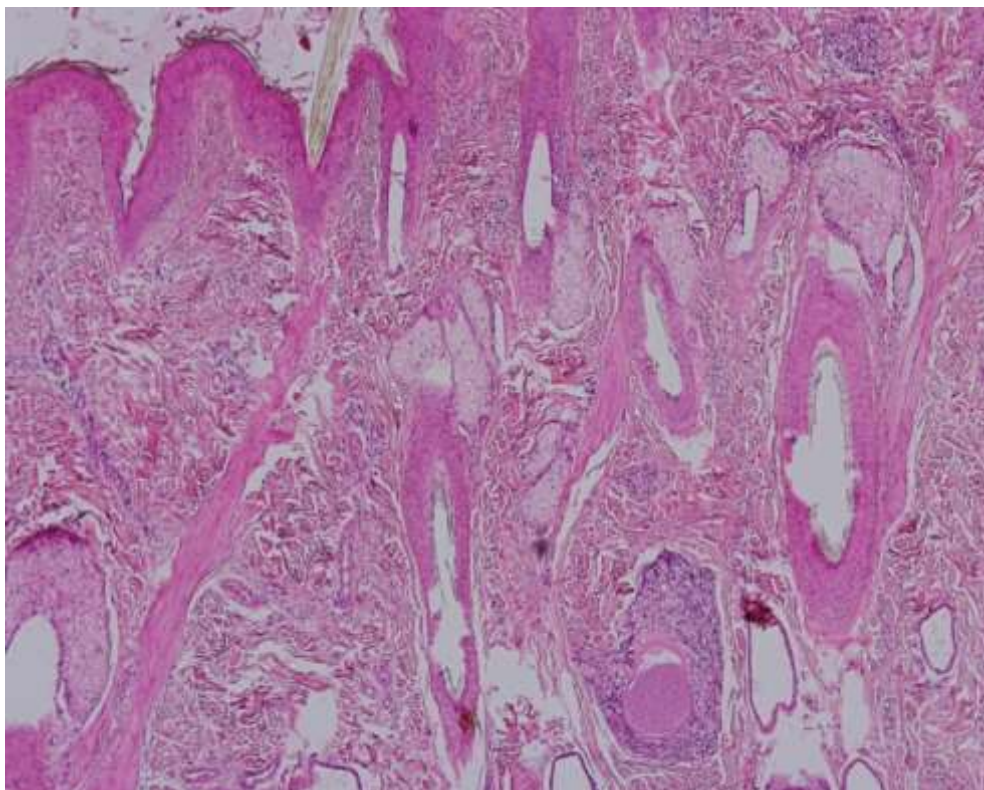


Ilustração 8 - Aspecto microscópico das lesões cutâneas características da fase crónica de besnoitiose bovina. Quistos de *Besnoitia besnoiti* junto à epiderme. Coloração HE, escala = 200 µm. Fonte: INIAV.

2.2.12.5 Tratamento

Apesar dos esforços desenvolvidos, não estão ainda disponíveis fármacos para o tratamento e prevenção da Besnoitiose bovina. O benefício do isolamento dos animais doentes, de preferência em estábulos bem arejados, com boas camas e um bom regime alimentar era reconhecido pelos primeiros autores e os cuidados gerais aos animais considerados essenciais. No caso de se justificar, poderá instituir-se uma terapêutica de suporte à base de antibióticos de largo espectro para combater as infeções secundárias, corticóides e anti-inflamatórios não esteróides, para diminuir a inflamação perivascular gerada pela multiplicação dos parasitas nas células dos vasos sanguíneos, e diuréticos, para diminuir os edemas.

Neste caso, o animal foi isolado da manada, tendo sido posteriormente enviado para abate por se tratar de um reservatório da doença. Foi aconselhado ao produtor a implementação de algumas medidas por forma a prevenir a disseminação da doença. Para o controlo de vetores foram recomendados banhos com inseticidas e/ou repelentes com frequência ao efetivo restante, principalmente nas épocas do ano onde existe maior densidade de vetores.

2.2.13 Caso Clínico 2

Em Dezembro de 2016, numa propriedade situada no Alentejo perto de Alcáçovas, foi atendido um bovino fêmea de raça Limousine com catorze anos de idade.

A queixa principal relatada pelo proprietário foi a exibição de lesões cutâneas de distribuição generalizada, bem como algumas zonas de alopecia, apatia e perda de peso (**Ilustração 9**). O proprietário descreveu que o início dos sinais clínicos decorreu há cerca de um mês, na região da cabeça, pescoço, membros anteriores e posteriores e que a terapia com antibióticos sistémicos não foi suficiente para a melhora clínica.

Durante o decorrer deste período de tempo, acrescentou que houve piora progressiva das manifestações, com disseminação das lesões por todo o corpo.



Ilustração 9 - Aspeto macroscópico das lesões cutâneas nas regiões da cabeça e pescoço. Esclerodermia e Alopecia. Fonte: Autor.

Após abordagem do animal, foram evidentes sinais clínicos compatíveis com a fase crónica de Besnoitiose.

2.2.13.1 Sinais Clínicos:

- Apatia;
- Anorexia;
- Relutância ao movimento;
- Algumas zonas localizadas de alopecia decorrentes da pele que se encontra friável;
- Observou-se também esclerodermia de distribuição generalizada, embora mais evidente na zona do pescoço;
- Descamação da pele na zona do focinho bem como presença de feridas;
- Espessamento e pregueamento da pele no pescoço;

O restante exame físico apresentava-se sem alterações.

2.2.13.2 Diagnósticos Diferenciais na fase crónica:

- Sarna sarcóptica;
- Pediculose;
- Dermatofilose;
- Paraqueratose;
- Fotossensibilidade;
- Intoxicação por mercúrio.

De forma a descartar as doenças supracitadas, foram realizados exames complementares tendo-se procedido à colheita de sangue para diagnóstico serológico pelo método de imunofluorescência indireta (IFI). Além deste, elegeu-se a cabeça num local de lesão cutânea para a obtenção de biópsia da pele utilizando-se um punch descartável de 8mm como se observa na **Ilustração 10**, tendo em vista a deteção histopatológica de quistos de *B. besnoiti*. As duas amostras recolhidas, obtidas a partir dos exames complementares realizados foram posteriormente enviadas para o Laboratório de Referência: INIAV.



Ilustração 10 - Biópsia de pele em zona afectada, com punch descartável de 8mm. Fonte: Autor.

2.2.13.3 Resultados

Após receção dos resultados por parte do INIAV, verificou-se, em análise da **Ilustração 11**, que o diagnóstico serológico se revelou positivo apresentando anticorpos específicos para *B. besnoiti*, assim como a biópsia da pele que apresentou um elevado número de quistos, confirmando-se assim o diagnóstico de infeção por *B. besnoiti* (**Ilustração 12**).

 Instituto Nacional de
Investigação Agrária e Veterinária, I.P.

Boletim de Análises

N.º de Análise: **PAT-17-00245**

EXAMES

Laboratório de Parasitologia <- Av. da República, Quinta do Marquês 2780-157 Oeiras
Exame(s) pretendido(s): Parasitológico - Pesquisa Besnoitia

Exame: ****Pesquisa de anticorpos anti-Besnoitia besnoitii por Imunofluorescência indirecta**

Técnico Responsável: 

Cod.: **300 pt**

Resultado:

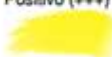
Positivo (+++)  **Legenda: (+) Fluorescência fraca, (++) Fluorescência média, (+++) Fluorescência forte**

Ilustração 11 - Resultados obtidos pelo Teste de Imunofluorescência Indirecta (IFI). Fonte: INIAV.

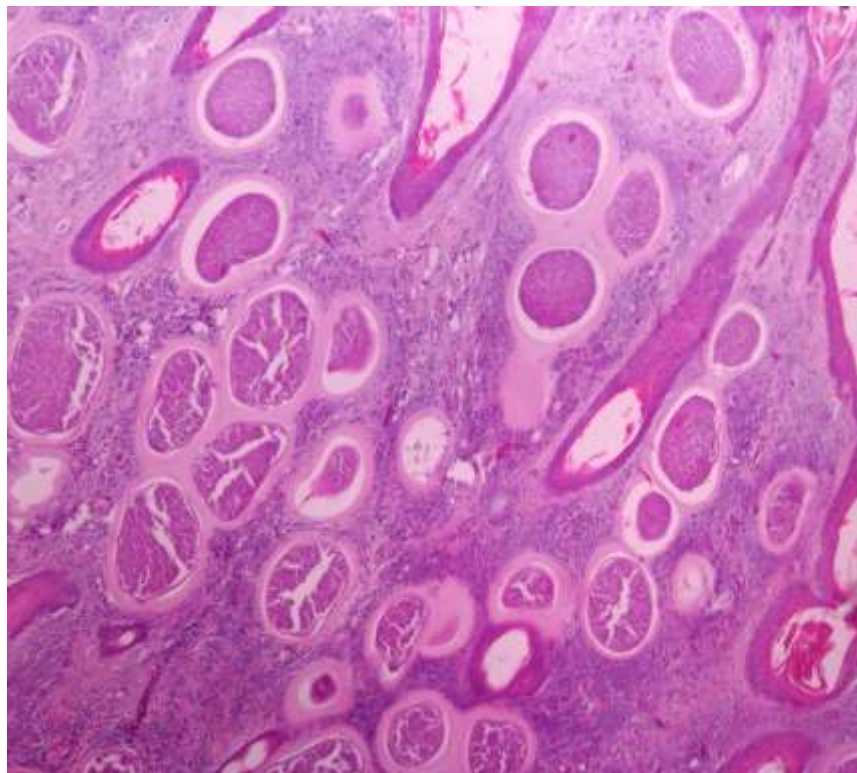


Ilustração 12 - Resultado obtido pela biópsia de pele. Observação de quistos de *Besnoitia besnoiti* ao microscópio óptico. Coloração HE, escala = 200 μ m. Fonte: INIAV.

2.2.13.4 Tratamento

Até ao momento, não é conhecido qualquer tratamento com resultados satisfatórios em animais infetados. Desta forma, nenhum tratamento foi aplicado ao animal, recomendando-se apenas o isolamento deste do restante grupo até à confirmação da suspeita pelos exames laboratoriais.

Revelando-se positivo para *B. besnoiti*, neste caso, foi sugerida a eutanásia, não só por se apresentar extremamente débil, mas por forma a controlar a disseminação da doença pelos restantes membros do grupo, dado que animais como estes são considerados reservatórios por possuírem um número elevado de quistos na pele.

Procedeu-se à eutanásia do animal optando-se por um processo físico. Utilizando-se uma arma de projétil, foram desenhadas duas linhas imaginárias entre o canto medial de um olho e a base do corno o lado oposto e efetuou-se o disparo,

perfurando o crânio (**Ilustração 13**) (Fouquet 2009). Esta causa concussão e/ou laceração do encéfalo ficando o animal instantaneamente inconsciente. Posteriormente recorreu-se a outro método, nomeadamente a sangria, para que sobreviesse a morte. Para o reconhecimento e confirmação da morte observou-se a paragem cardíaca bem como respiratória e ausência do reflexo corneal e palpebral (Fouquet 2009). A partir desse momento, instalam-se os fenómenos cadavéricos mediatos, nomeadamente o início da rigidez cadavérica.

Foi ainda recomendado como método de controlo dos vetores, banhos com inseticidas, ou repelentes com frequência ao efetivo restante, principalmente nas épocas do ano onde existe maior densidade de vetores.



Ilustração 13 -Ponto de aplicação no crânio da arma de estilete/projétil. Fonte: **(Peleteiro, et al., 2016)**.

CAPITULO IV – Discussão

Segundo Hofmeyr (1945), a Besnoitiose bovina constituiu-se como uma doença que atinge animais adultos. Num vasto trabalho desenvolvido na África do Sul, não se encontrou qualquer animal doente com idade inferior aos 18 meses, sendo que a única exceção referida na bibliografia parece ser a de dois casos de doença encontrados por Bigalke (1968).

Quando a infeção surge numa exploração de bovinos, cerca de 10% do efetivo acabará por desenvolver sintomatologia, sendo responsável por graves prejuízos económicos (Pols, 1960). Os animais afetados perdem peso, algumas fêmeas abortam, a produção de leite decresce consideravelmente, os touros tornam-se estéreis e as peles perdem todo o valor comercial. Não parece haver diferenças na suscetibilidade entre diferentes raças ou entre qualquer um dos sexos. Franco e Borges (1915) referem a doença em animais de raça Alentejana e de raça Brava. Leitão (1949) regista a ocorrência da doença principalmente no Sul de Portugal e predominantemente em animais de raça Alentejana. Bigalke (1968) e Pols (1960) referem ser a raça Afrikaner tão suscetível como as raças Hereford, Holstein-frísia, Short Horn, Brâmane ou animais cruzados. Juste *et al.* (1990) e Irigoien *et al.* (2000) verificaram morbilidade em animais de raça Holstein-Frísia no País Basco.

Atualmente, na clínica de animais de produção, cada vez mais são os casos em que Besnoitiose é diagnosticada. O desconhecimento da doença por parte dos produtores, bem como a falta de meios de prevenção e tratamento dos animais acometidos, constitui o principal problema no sucesso destes casos.

Os casos acompanhados demonstraram-se semelhantes na anamnese, sintomatologia apresentada e no tratamento e recomendações a realizar, apesar de serem animais de raça, idades e sexos diferentes.

Um dos problemas encontrados prendeu-se no facto de os produtores não concordarem com a realização de exames complementares necessários à confirmação da suspeita de *B.besnoiti*, por se tratar de mais uma análise que implica um custo acrescido.

No entanto, para os dois casos conseguiu-se, ainda assim, que se realizassem dois exames complementares de diagnóstico. O diagnóstico laboratorial através do diagnóstico serológico, é considerado um dos meios de eleição, pois permite a deteção de anticorpos específicos pelo método de imunofluorescência indireta, teste que possui características como elevada sensibilidade e especificidade e o diagnóstico por histopatologia da derme.

Este último é outro método de elevada relevância no diagnóstico, uma vez que, permite a visualização de quistos na derme, visando não só a confirmação da suspeita, como vem também confirmar os resultados obtidos pela serologia.

Outro ponto que diferencia os dois casos acompanhados prende-se na parte reprodutiva, isto é, apesar de no primeiro caso a fêmea não estar gestante, é importante salientar que, se efetivamente estivesse, uma das consequências da doença poderia ser o aborto.

No segundo caso, a infertilidade seria uma das consequências com maior repercussão a nível reprodutivo, dado que, a fase crónica manifesta-se também, além dos sinais clínicos supracitados, sob a forma de orquites severas, provocando infertilidade geralmente definitiva, com necrose, calcificação e atrofia testicular uni ou bilateral, tornando-se aspermatogénicos.

No caso acompanhado, apesar de evidenciar sinais clínicos compatíveis *B. besnoiti*, o touro não apresentava sinais evidentes de orquite ou necrose. No entanto, seria interessante avaliar o estado reprodutivo por forma a perceber qual o grau de infertilidade. A este animal não foi realizado, em nenhum momento, exame andrológico e o proprietário não manifestou interesse na sua realização. Contudo, a presença na manada de um animal infetado implica um potencial risco de transmissão da doença. Nestas circunstâncias a deteção destes animais numa fase inicial da infeção e a adequação de medidas conducentes ao controlo da morbilidade deverão ser implementadas de modo a atenuar o impacto económico da Besnoitiose na exploração ou área geográfica na qual ela se insere.

O rastreio da infeção, bem como o acompanhamento dos efetivos suspeitos, adquire elevada importância no sucesso do diagnóstico desta doença. Assim sendo, nestes dois casos apresentados seria de enorme interesse a colheita de sangue a todos os animais com mais de seis meses de idade para análise serológica, a fim de compreender em ambas as explorações qual a prevalência da doença. No caso de a prevalência ser baixa é recomendada a eliminação de todos os animais positivos, enquanto que, no caso da prevalência se demonstrar elevada, eliminar a doença gradualmente seria a medida mais correta. Esta inclui o refúgio dos animais doentes, a separação dos animais serologicamente positivos e negativos em lotes, especialmente nos meses de verão e a separação destes das explorações vizinhas.

CAPÍTULO V – Conclusão

A Besnoitiose bovina tem vindo a crescer de forma global nas últimas décadas na Europa. Em Portugal, a doença esteve desaparecida durante vários anos, tendo reaparecido recentemente tornando-se reemergente segundo a classificação da EFSA.

Presentemente não são conhecidos tratamentos eficazes no combate à infeção, podendo apenas ser feito o tratamento e prevenção de infeções secundárias oportunistas. Torna-se assim imperativo eliminar os animais doentes, que se tornam reservatórios por possuírem um número elevado de quistos. Esses quistos, contêm bradizoítos e vão servir de alimento aos vetores que os transmitem no momento da picada.

O controlo dos vetores é também indispensável, uma vez que se atribui um papel importante a insetos hematófagos, enquanto vetores, na transmissão da Besnoitiose bovina, a fim de evitar a disseminação do *B. besnoiti*. Para isso devem realizar-se banhos com inseticidas, ou aplicar-se repelentes com frequência, principalmente nas épocas do ano onde existe maior densidade de vetores.

É importante sensibilizar os produtores para esta doença, os seus sinais clínicos, formas de transmissão e implicações na produtividade do efetivo.

A perda de condição corporal nos animais doentes traduz-se em prejuízos económicos, a produção de leite diminui e as peles perdem valor comercial. A nível reprodutivo pode haver grandes repercussões, uma vez que os touros ficam estéreis e a fêmeas podem abortar, principalmente se a gestação ocorrer na fase aguda da doença.

A prevenção passa por evitar que a doença entre na exploração, uma vez que tratar ou vacinar não é possível. Recomenda-se a análise serológica através da colheita de sangue aos animais adquiridos. No caso de efetivos infetados deve-se tentar limitar a infeção, separando e/ou eliminando os animais infetados e eliminando os animais doentes. Para controlar a disseminação do parasita, é fundamental o controlo do vetor com a aplicação de inseticidas.

Referências Bibliográficas

- Agosti, M, A Belloli, B Morini, e G Vacirca. “Segnalazione di um focolaio di besnoitiosi in bovini da carne importati.” *Praxis*,15, 1994: 5-6.
- Alvarez, García, Luis Miguel Ortega Mora, Schares Gereon, e F.Frey Caroline. “A century of bovine besnoitiosis: an unknown disease re- emerging in Europe.” *Trends in Parasitology*, 2013: 409-413.
- Alzieu, J.P, P Dorchies, F Schelcher, e B Gottstein. “L' extension de la besnoitiosis bovine en France.” *Le point Vétérinaire*, 276, 2007: 37-43.
- Authority, European Food Safety. “Scientific statement on Bovine besnoitiosis.” *EFSA Journal*, 2010: 7-10.
- Barrairon, E. “Contribuion a le' étude étiologie de l' anasarque du boeuf.” *Thesis, Toulouse vet. bull. vol 9*, 1938: 465.
- Basso, W, G Schares, NS Gollnick, M Rutten, e P Deplazes. “Exploringthe life cycle of *Besnoitia besnoiti*- experimental infection of putative definitive and intermediate host species. .” *Vet Parasitol.*178 (3-4), 2011: 223-234.
- Basson, P A, J W van Niekerk, R M McCully , e R D Bigalke. “Besnoitiosis in the south african antelopes: A preliminary note on the occurence of besnoitia cysts in the cardiovascular system.” *J.S Afr. Vet. Med. ASS.*36, 1965: 578.
- Basson, P A, R M McCully, e R D Bigalke. “Observations on the Pathogenesis of bovine and antelope strains of *Besnoitia besnoiti* (Marotel, 1912) infection in cattle and rabbits.” *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 37, 1970: 105-126.
- Beck, R, I Stokovic, e J Pleading. “Bovine besnoitiosis in Croacia. In Vaz Y (Ed), Proceedings of the second International meeting on the Apicomplexan parasites in farm animals, Kusadas, Turkey, 31 October - 2 november .” 2013: 64.
- Bennet, S.C J. “*Globidium* infection in the sudan *J.Comp. Path.*” 1933: 1-15.
- Besnoit, C, e V Robin. *Sarcosporidiosis cutanée chez une vache. Rec. Vet.* 37: 649. 1912.
- Bigalke, R. *Besnoitiosis and Globidiosis. In: Ristic, M, McIntyre, Disease of cattle in tropics. Marunus Nijhoff, The Hague, The Netherlands.* I. 1981.
- Bigalke, R D. “Preliminary observations on the mechanical transmission of cysts of *Besnoitia besnoiti* (Marotel, 1912) from a chronically infected bull to rabbits by *Glossina brevipalpis* .” *Newstead, 1910. J.S.Afr.Vet.Med.Assoc.*, 31, 1960: 37-44.
- Bigalke, R D, e L Prozesky. “Besnoitiosis. In: Coetzer, J. A.W, Tustin, R.C (Eds), Infectious diseases of Livestock.” *Oxford University Press, Cape town*, 2004: 351-359.

- Bigalke, R D, J H Schoeman, e R M McCully. "Immunization against bovine besnoitiosis with a live vaccine prepared from a blue wildebeest strain of besnoitia besnoiti grown in cell cultures studies on rabbits." *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 41, 1974: 1-5.
- Bigalke, R.D. "New conception of the epidemiological features of bovine besnoitiosis as determined by laboratory investigations." *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 35, 1968: 3-137.
- Bigalke, R D, e J H Schoeman. "An outbreak of bovine besnoitiosis in the orange free state, Republic of South Africa, JLS. Afr. Vet. Med., 33." 1967: 21-27.
- Bilgake, R. *Besnoitiosis and Globidiosis. In: Ristic, M, McIntyre, Disease of cattle in tropics. Marunus Nijhoff, The Hague, The Netherlands. I.* 1981.
- Bilgake, R.D. "New conception of the epidemiological features of bovine besnoitiosis as determined by laboratory investigations. ." *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 35, 1968: 3-137.
- Cádeac, C. "Identité de l'éléphantiasis et l'anasarque du bouef. Description de cette maladie." *Revue vétérinaire*, 1884: 521.
- Caeiro , V, M L Ferreira, e S Branco . "Besnoitiose Bovina no Alentejo." *Acta Parasitológica Portuguesa* 8, 2001: 143.
- Cortes, H C, N Mueller, M Esposito, A Leitão, A Naguleswaran, e A Hemphill. "In vitro efficacy of nitro-and bromo-thiazolyl-salicylamide compounds(thiazolides) against Besnoitia besnoiti infection in vero cells." *Parasitology*, 134, 2007: 975-985.
- Cortes, H C, N Muller, D Boykin, C E Stephens, e A Hemphill. "In vitro effects of Besnoitia besnoiti infection in Vero cells." *Parasitology*, 138, 2011: 583-592.
- Cortes, H, H Reis, B Gottstein, A Hemphill, A Leitão, e N Muller. "application of conventional and real-time fluorescent ITS1 rDNA PCR for detection of Besnoitia besnoiti infections in bovine skin biopsies." *Vet Parasitol* 146, 2007: 352-356.
- Cortes, Hélder, M L Ferreira, J F Silva, R Vidal, P Serra, e V Caeiro. "Contribuição para o estudo da Besnoitiose bovina em Portugal." *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 2003.
- Cortes, Hélder, M L Ferreira, J F Silva, R Vidal, P Serra, e V Caeiro. "Contribuição para o estudo da Besnoitiose bovina em Portugal." *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 2003.
- Cortes, Hélder, M.L Ferreira, J.F Silva, R Vidal, P Serra, e V Caeiro. "Contribuição para o Estudo da besnoitiose bovina em Portugal." *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias* , 2003: 43-46.
- Cuillé, J. C, P- L Chelle, e F. Berlureau. "Transmission de la maladie expérimental dénommée "Sarcosporidiose cutanée" du boeuf (Besnoit et Robin) et déterminée

- par *Globidium besnoiti*.” *Bulletin de l' académie nationale de médecine*, 1936: 115, 161-163.
- Diesing, L, et al. “*Besnoitia besnoiti*: studies on the definitive host and experimental infection in cattle.” *Parasitology Research*, 75, 1988: 114-117.
- “Direção - Geral de Alimentação Veterinária (DGAV) .” *Programa de Vigilância da Leucose enzoótica bovina (LEB) nas Regiões Oficialmente indemnes no continente*, 2012: 1-17.
- Dubey, J P. “*Toxoplasma Hammondia*, *Besnoitia*, *Sarcocystis* and other tissue cyst-formation coccidia of man and animals. In: *Parasitic protozoa*, vol 3.” (Academic Press) 1997.
- Dubey, J P, e M J Yabsley. “*Besnoitia neotomofelis* n. sp.(Protozoa: Apicomplexa) from the SOuthern plains Woodrat (*Neotoma micropus*).” 2010.
- Dubey, J P, et al. “*Besnoitia oryctofelisi* n. sp. (Protozoa: Apicomplexa) from domestic rabbits.” *Parasitology*, 126, 2003: 521-539.
- Dubey, J P, et al. “Establishment of *Besnoitia darling* from opossums (*Didelphis virginiana*) in experimental intermediate and definitive hosts, propagation in cell culture, and description pf ultrastructural and genetic characteristics. .” *International Journal for Parasitology*, 32, 2002: 240-244.
- Eckert, J , M Rommel, e E Kutzer. “Systematik an Taxonomie Veterinarmedizinische Parasitologie editor by J. Eckert, E. Kutzer, M.Rommel, H.Burger e W. Korting.” *Berlin: Paul Parey* , 1992: 4-22.
- Ellis, J T, O J Holmdahl, C Ryce, J M Njenga, P A Harper, e D A Morrison. “Molecular phylogeny of *Besnoitia* and the genetic relationships among *Besnoitia* of cattle, wildbeest and goats. .” *Protist*, 151, 2000: 329-336.
- European Food Safety Authority. “Scientific statement on Bovine besnoitiosis.” *EFSA Journal*, 2010: 7-10.
- Fernandez, García, et al. “First isolation of *Besnoitia besnoiti* fom a chronically infected cow in Spain.” *Journal of parasitology*, 2009: 474-476.
- Fernandez-García, A, et al. “Development and use of an indirect Elisa in outbreak of bovine besnoitiosis in Spain.” *Veterinary Record*, 166, 2010: 818-822.
- Ferreira, M L, e O H Dias. “Importancia de la besnoitiosis en la fertilidad de los toros. .” *1o International Congress on Animal Reproduction and Artificial insemination*, 1984.
- Ferreira, M L, J L Nunes Petisca, e O H Dias. “Alterações testiculares em touros de Moçambique assintomáticos e com sintomas clinicos de Besnoitiose.” *Rep. Trab. I. N. XIV*, 1982: 97-108.
- Ferrié, J J. “La besnoitiose bovine.” *Revue bibliographique.Observations personnelles. France: Thesis, École Nationale Vétérinaire de Toulouse.*, 1984: 288.

- Ferrira M, L. “Besnoitiose bovina. ASpectos anatomo-clinicos. Tipografia Minerva central: Maputo, R. P Moçambique .” 1985: 110.
- Fouquet, Marie Claudine. “La besnoitiose bovine: suivi épedémiologique de l'épizootie de la région PACA.” Lyon, 2009.
- Franco, E E, e I Borges. “Nota sobre a sarcosporidiose bovina.” *Revista de Medicina Veterinária* 165, 1915: 255-299.
- Franco, E E, e I Borges. “Sur la Sarcosporidiose Bovine. Arq. Inst. Bact. Camara Pestana.vol.4.” 1916: 269-289.
- Goldman, M, e E Pipano. “Serological studies on bovine besnoitiosis in Israel.” *Trop Anim Health in Prod* 15, 1983: 32-38.
- Herin, V.V. “Note sur le existence de la Globidiose bovina au Ruanda-Urundi. Ann. soc. Belgo Med. Trop. vol.32.” 1952: 155-160.
- Hofmeyr, C.F.B. “Globidiosis in Cattle.” *J. South Afric. Vet.med. Ass. vol 16*, 1945: 102-109.
- Hornok, S, A Fédak, F Baska, R Hofmann-Lehmann, e W Basso. “Bovine besnoitiosis emerging inCentral-Eastern Europe, Hungary.” *Parasit Vectors*, 2014: 7,20.
- Jacquet, P, E Liénard, e M Franc. “Bovine besnoitiosis: epidemiological and clinical aspects.” *Veterinary Parasitology*,174, 2010: 30-36.
- Leitão, J.L.S. “Globidiose bovina por globidium besnoiti (Marotel 1912). Anasarca bovina.” *Resvista de Medicina Veterinária*,330 , 1949: 152-158.
- Lesser, M, U Braun , P Deplazes, B Gottstein, M Hilbe, e W Basso. “First cases of besnoitiosis in cattle in switzerland.” *Schweizer Archiv fur Tierheilkunde*, 154, 2012: 469-474.
- Malta, M, e M Silva. “Besnoitiose no Alentejo.” *XIV Jornadas d Medicina Veterinária "Bovinos de carne"*, 1991.
- Marotel, M. “Discussion of paper by Besnoit and Robin, Bull.et Mém.de la Société de Sciences Veterinaires de Lyon et de la Société de Medicine Vétérinaire de Lyon et du Sud-Est .” 1912: 196-217.
- . *Discussion of paper by Besnoit and Robin. Bull ate Mem. de la Soc. des Sciences Vet.de Lyon et de la Soc. de Med. Vet. de Lyon e du Sud-Et* 15. 1912.
- Mehlhorn, H, S Klimpel, E Schein, A Heydorn, S Al-Quraishy, e J Selmair. “Another African disease in Central Europa: Besnoitiosis of Catlle.I. Light and electron microscopical study.” *Parasitology Research*, 104, 2009: 861-868.
- Njenga, J M, O Bwangamoi, E K Kangethe, G M Mugeru, e E R Mutiga. “Comparative ultrastructural studies on Besnoitia besnoiti and Besnoitia caprae.” *Veterinary Research Communications*, 19, 1995: 295-308.
- Peleteiro , Maria da concição, et al. *Manual de Necrópsia Veterinária* . LIDEL, 2016.

- Peteshev, V M, I G Galuzo, e A P Plomoshnov. *Cats - Definitive hosts of besnoitia(besnoitia besnoiti)*. 1974.
- Pipano, E. "Vaccines against Hemoparasitic diseases in Israel with a special reference to quality asurance." *Tropical Animal Health and production*, 29, 1997: 86-90.
- Pissarra, Luis Abel Monteiro Martins. "Estudo da infecção por Besnoitia besnoitii:Aplicação da Imunohistoquímica na Avaliação da resposta celular inflamatória Peri-quística." Lisboa, 2008.
- Pols, J W. *Studies on bovine besnoitiosis with special reference to the aetioogy. Onderstepoort J. Vet. Res.* Vol. 28. 1960.
- Rommel, M. *Comparative Review of the developmental biology of the genera sarcocystis, Frenkelia, Isospora, Cystoisospora, Hammondia, Toxoplasma and Besnoitia*. 1978.
- Schares, G, et al. "First in vitro isolation of Besnoitia besnoiti from chronically infected cattle in Germany." *Veterinary Parasitology*, 163, 2009: 315-322.
- Shkap, V, D T de Waal, e F T Potgieter. "Chemotherapy of experimental Besnoitia besnoiti infection in rabbits." *Onderstepoort Journal of veterinary Research*, 52, 1985: 289.
- Shkap, V, E Pipano, A Reske, L Fish, e T Baszler. "immunological relationship between Neospora caninum and Besnoitia besnoiti." *Vet Parasitol* 106, 2002: 35-43.
- Shkap, V, E Pipano, e C Greenblatt. "Cultivation of Besnoitia besnoiti and evaluation of susceptibility of laboratory animals to cultured parasites." *Veterinary Parasitology*, 23, 1987: 169-178.
- Shkap, V, E Pipano, S Marcus, e Y Krigel. "Bovine besnoitiosis: transfer of colostral antibodies with observations possibly relating to natural transmission of the infection. ." *Onderstepoort Journal of the Veterinary Research*, 61, 1994: 273-275.
- Shkap, V, F.R Matuschka, B Yakobson, S Perl, M Frank, e E Pipano. "Differentiating between Besnoitia Besnoiti from cattle and sarcocystis hoarensis from rodents." *Parasitol Res*, 81, 1995: 490-493.
- Shkap, V, H Ungar-Waron, E Pipano, e C Greenblatt. "Enzyme linked immunosorbent assay for detection of antibodies against Besnoitia besnoiti in cattle." *Trop Anim Health Prod* 16, 1984: 233-238.
- Shkap, V; Matuschka, F.R; Yakobson, B; Perl, S; Frank, M; Pipano, E. "Differentiating between Besnoitia Besnoiti from cattle and sarcocystis hoarensis from rodents." *Parasitol Res*, 81, 1995: 490-493.
- Smith, D D, e J K Frenkel. "Besnoitia darlingi (Apicomplexa, Sarcocystidae, Toxoplasmatinae): transmission between opossums and cats." *Journal of Protozoology*, 31, 1984: 584-587.

- Smith, D D, e J K Frenkel. “Besnoitia darlingi (Protozoa: Toxoplasmatinae): cyclic transmission by cats.” *Journal of Parasitology*, 63, 1977: 1066-1071.
- Waap, Helga Marlene Cardoso. “Epidmiologia e Diagnóstico da Besnoitiose bovina em Portugal.” Lisboa , 2015.
- Waap, Helga, Telmo Nunes, Helder Cortes , Alexandre Leitão, e Yolanda Vaz. “Percepção da besnoitiose bovina em Portugal - Questionário aos Médicos Veterinários do campo.” *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 2015: 201-208.
- Wallace, G D, e J K Frenkel. *Besnoitia Species (Protozoa, Sporozoa, Toxoplasmatidae) : Recognition of cyclic transmission by cats*. 1975.

Anexo 1

Direcção Regional da Economia do Algarve

Edição n.º 201/2011

Processo N.º EPU N.º 3483

Faz-se público que, nos termos e para os efeitos do artigo 19.º do Regulamento de Licenças para Instalações Eléctricas, aprovado pelo Decreto-Lei n.º 26 852, de 30 de Julho de 1936, com redacção dada pela Portaria n.º 344/89, de 13 de Maio, estará patente na Secretaria do Município de Castro Marim e nesta Direcção Regional, sita em Rua Prof. António Pinheiro e Rosa, 8005-546 Faro, com o telefone 289896600, fax 289896690, e-mail dre-algarve@dre.alg.mir-economia.pt, todos os dias úteis, durante as horas de expediente, pelo prazo de quinze dias, a contar da publicação deste título no "Diário da República", o projecto apresentado pela EDP Distribuição — Energia, S. A., para o estabelecimento de Linha Aérea a 60 kV, com 24900 m, referente a dorso da linha LA60-0136 Tavira-Beliche, compreendendo-se até à subestação SF60-0623 Castro Marim, sendo o dorso feito a partir do apoio n.º 71, com inscrição de 12 novos apoios em linha dupla, pertencente a EDP Distribuição — Energia, S. A., a estabelecer em Vale do Andor/Corro da Dobra/Vale Teuro, freguesia de Castro Marim, concelho de Castro Marim, a que se refere o processo mencionado em epígrafe.

Todas as reclamações contra a aprovação deste projecto deverão ser apresentadas nesta Direcção Regional da Economia ou na Secretaria da parte Municipal, dentro do prazo.

12-04-2011. — O Director de Serviços de Energia, Carlos Mascara.
304593134

Instituto Português da Qualidade, I. P.

Despacho n.º 8833/2011

Organismo de verificação metroológica de Indicadores Automáticos de Referência do Nível de Líquidos

1 — Abrevia da Portaria n.º 1544/2007, de 6 de Dezembro, foi publicado o regulamento de controlo metroológico de Indicadores Automáticos de Referência do Nível de Líquidos.

2 — Verifica-se a necessidade de descentralizar a realização das operações de controlo metroológico envolvidas, por forma a simplificar os procedimentos administrativos, sem prejuízo do necessário rigor metroológico.

3 — Assim, para efeitos de aplicação da Portaria n.º 1544/2007, de 6 de Dezembro, e nos termos da alínea c), do ponto 1, do artigo 8.º, do Decreto-Lei n.º 291/90, de 20 de Setembro, determina:

a) É reconhecida a qualificação à empresa SGS Portugal — Sociedade Geral de Superintendência, S. A., com sede no Polo Tecnológico de Lisboa, n.º 6, piso 0 e piso 1, 1600-546 Lisboa e instalações na Rua Padre António, 212, 4.º piso, freguesia 4.4, 4470-136 Maia, para a execução das operações de verificação metroológica de Indicadores Automáticos de Referência do Nível de Líquidos;

b) A referida empresa colocará, nos termos da legislação em vigor, a respectiva marca própria, anexa ao presente despacho, bem como o símbolo da operação de controlo metroológico, no esquema de selagem dos instrumentos de medição abrangidos pelo regulamento atrás referido;

c) Das operações envolvidas, serão mantidas em arquivo as relações dos ensaios correspondentes às operações de controlo metroológico, nos termos da lei;

d) Mensalmente deverá a empresa enviar ao IPQ uma relação dos instrumentos que forem verificados, assim como efectuar o pagamento dos montantes correspondentes às operações de controlo metroológico realizadas, até ao dia 10 do mês seguinte, mediante cheque endossado ao Instituto Português da Qualidade, remetido à Unidade de Metrologia Legal, Rua António Gato, n.º 2, 2825-513 CAPARICA;

e) O valor da taxa aplicável às operações previstas no regulamento acima referido, será definido por despacho e revisto anualmente.

4 — O presente despacho é válido até 31 de Dezembro de 2013, e substitui o Despacho n.º 6034/2008, publicado no Diário da República, 2.ª série, n.º 45 de 4 de Março de 2008.

15 de Fevereiro de 2011. — Presidente do Conselho Directivo, J. Marques da Silva.



304555387

Despacho n.º 8634/2011

Instrumentos de Pesagem Separadores de Funcionamento Automático

Tendo em vista acentuar a eficiência e operacionalidade dos serviços de metrologia, delego a competência do Instituto Português da Qualidade para o exercício das operações de verificação periódica, verificação extraordinária e primeira verificação após a reparação de instrumentos de pesagem separadores de funcionamento automático, previstas no n.º 1, dos artigos 5.º, 6.º e 7.º, da Portaria 53/2007, de 10 de Janeiro, na Direcção Regional da Economia, Inovação e Desenvolvimento de Lisboa e Vale do Tejo.

23 de Março de 2011. — O Presidente do Conselho Directivo, J. Marques da Silva.

304556464

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA,
DO DESENVOLVIMENTO RURAL E DAS PISCAS

Autoridade Florestal Nacional

Declaração de rectificação n.º 752/2011

Tendo sido publicado com inexactidão o despacho n.º 6239/2011 no Diário da República, 2.ª série, n.º 71, de 11 de Abril de 2011, procede-se agora à sua rectificação.

No n.º 1, alínea b), onde se lê «agora os meios humanos e os equipamentos afectos à Divisão Financeira e Patrimonial» deve ler-se «agora os meios humanos e os equipamentos afectos à equipa multidisciplinar de gestão de projectos».

11 de Abril de 2011. — O Presidente, António José de Oliveira Torres.

204592663

Direcção-Geral de Veterinária

Despacho n.º 8635/2011

O Despacho n.º 16666/2010, de 25 de Outubro, publicado na 2.ª série do Diário da República n.º 213, de 3 de Novembro de 2010, ficou ao registo respeitante à identificação dos animais das espécies ovina e caprina.

Portes, atendendo a que aquele despacho contém algumas deficiências que devem ser supridas, importa revogar o mesmo.

Assim, ao abrigo do disposto no n.º 5 do artigo 2.º do Anexo II, ao Decreto-Lei n.º 142/2006, de 27 de Julho, com as alterações que lhe foram introduzidas pelo Decreto-Lei n.º 214/2008, de 10 de Novembro, e pelo Decreto-Lei n.º 316/2009, de 29 de Outubro, os ovinos e caprinos, no território nacional, para além da marca auricular convencional, devem ser identificados com um bolo reticular.

1 — Para efeitos do disposto no n.º 5 do artigo 2.º do Anexo II, ao Decreto-Lei n.º 142/2006, de 27 de Julho, com as alterações que lhe foram introduzidas pelo Decreto-Lei n.º 214/2008, de 10 de Novembro, e pelo Decreto-Lei n.º 316/2009, de 29 de Outubro, os ovinos e caprinos, no território nacional, para além da marca auricular convencional, devem ser identificados com um bolo reticular.

2 — Em derrogação do previsto no número anterior, os ovinos e caprinos jovens, destinados ao trânsito intracomunitário ou para Países Terceiros, bem como os adultos de pequeno porte, podem ser identificados, com um brinco electrónico em substituição do bolo reticular.

18314

Diário da República, 2.ª série — N.º 81 — 27 de Abril de 2011

3 — Os meios de identificação dos crinos e caprinos, serão disponibilizados, pela Direcção-Geral de Veterinária, aos detentores dos animais, directamente ou através das suas associações.

4 — Consoante os animais a identificar, os meios de identificação podem ser distribuídos isoladamente ou organizados nos designados «kits electrónicos» constituídos por:

- a) Brinco convencional salmão ou verde na parte macho e amarelo na parte fêmea, a aplicar no pavilhão auricular esquerdo e bolo reticular com o mesmo código do brinco convencional, ou
- b) Brinco convencional amarelo, a aplicar no pavilhão auricular direito e brinco electrónico amarelo, a aplicar no pavilhão auricular esquerdo, com o mesmo código do brinco convencional.

5 — Os meios de identificação, são facultados aos detentores da exploração de pequenos ruminantes e aplicados até aos 6 ou 9 meses, após o nascimento dos animais, caso se encontrem, respectivamente, nas situações a que se referem os n.ºs 3 e 4 do artigo 2.º do Anexo II, do referido Decreto-Lei n.º 142/2006, de 27 de Julho, com as alterações que lhe foram introduzidas pelo Decreto-Lei n.º 214/2008, de 10 de Novembro, e pelo Decreto-Lei n.º 316/2009, de 29 de Outubro.

6 — Em caso de perda ou ilegibilidade da marca auricular convencional que faz parte do kit electrónico, ou para efeitos de identificação provisória nas intervenções em que ainda não é possível aplicar o bolo reticular, serão utilizados os denominados meios de identificação de substituição, os quais terão as seguintes características:

- a) Um código diferente do original, sendo a relação entre os dois mencionada no Registo de Existências e Designações (RED);
- b) As marcas terão a parte macho de cor salmão ou verde e a parte fêmea de cor vermelha.

7 — Os meios de identificação de substituição serão aplicados da seguinte forma:

- a) No pavilhão auricular esquerdo, quando consista numa substituição;
- b) No pavilhão auricular direito, quando consista numa identificação provisória.

8 — Em caso de perda ou ilegibilidade do bolo reticular ou do brinco electrónico, serão aplicados novos «kits electrónicos», retirando-se previamente a marca auricular convencional, devendo esta alteração ser mencionada no RED.

9 — Em derrogação do disposto nos artigos anteriores, os animais que, até aos 12 meses após o nascimento, dentro do território nacional, sejam encastilhados, directamente para abate ou para um centro de agrupamento que os conduza igualmente para abate, podem ser identificados com uma marca auricular adquirida pelo detentor, com o código da exploração de nascimento, aplicada no pavilhão auricular esquerdo.

10 — É revogado o Despacho n.º 16666/2010, de 25 de Outubro, publicado na 2.ª série do *Diário da República* n.º 213, de 3 de Novembro de 2010.

11 de Abril de 2011. — A Directora-Geral de Veterinária, Sónia Queiroz Pombo.

204595952

Direcção Regional de Agricultura e Pescas do Norte

Direcção de Serviços de Apoio e Gestão de Recursos

Despacho n.º 6636/2011

Obtido o acordo da Direcção-Geral de Veterinária, foi autorizada a Mobilidade Interna na Categoria, abrigo do disposto no artigo 59.º e os da Lei n.º 12-A/2008, de 27 de Fevereiro, do Técnico Superior, Eduardo Manuel Maia Pimentel Tavares, para desempenhar funções na Direcção Regional de Agricultura e Pescas do Norte, nos termos do n.º 1 do artigo 63.º da supra citada legislação, na redacção dada pelo artigo 18.º da Lei n.º 3-R/2010, de 28 de Abril, com efeitos a 1 de Abril de 2011.

8 de Abril de 2011. — A Directora dos Serviços de Apoio e Gestão de Recursos, Adília Josefa Ribeiro Domingues.

204595863

Direcção Regional de Agricultura e Pescas de Lisboa e Vale do Tejo

Despacho (extracto) n.º 6637/2011

Por despacho de 29 de Março de 2011, do Senhor Director Regional-Adjunto de Agricultura e Pescas de Lisboa e Vale do Tejo, e nos termos do n.º 2 do artigo 25.º da Lei n.º 2/2004, de 15 de Janeiro, alterada pela Lei n.º 51/2005, de 30 de Agosto foi autorizada, a seu pedido, a cessação da Comissão de Serviço, da Licenciada, Kátia Maria de Figueiredo Gomes Teixeira, que viria exercendo o cargo como Dirigente Intermediária de 2.ª Grau, como Chefe de Divisão de Agricultura, com efeitos a 1 de Abril de 2011.

29 de Março de 2011. — O Director Regional, Nuno Ruano.

204598211

MINISTÉRIO DAS OBRAS PÚBLICAS, TRANSPORTES E COMUNICAÇÕES

Gabinete do Secretário de Estado Adjunto, das Obras Públicas e das Comunicações

Despacho n.º 6638/2011

Pelo meu despacho n.º 22 306/2009, de 30 de Setembro, publicado no *Diário da República*, 2.ª série, n.º 195, de 8 de Outubro de 2009, foi declarada a utilidade pública, com carácter de urgência, da expropriação das parcelas de terreno necessárias à construção da obra do lanço A — A 26-IP 8 — nó de Roncão (IC 33)-nó de Orlandina Sul (IP 1).

Considerando a necessidade de se proceder à correção ao projecto de execução, declaro, nos termos do disposto na alínea a) do n.º 1 do artigo 14.º e do n.º 2 do artigo 15.º do Código das Expropriações, aprovado pela Lei n.º 168/99, de 18 de Setembro, alterada e republicada pela Lei n.º 56/2008, de 4 de Setembro, atento o despacho da vogal do conselho de administração da EP — Estradas de Portugal, S. A., de 15 de Março de 2011, que aprovou as plantas parcelares n.ºs 802-A-80320-E-B, folha 1/17 e 17/17 e o mapa de áreas relativo à construção da obra do lanço A — A 26-IP 8 — nó de Roncão (IC 33)-nó de Orlandina Sul (IP 1) — aditamento n.º 1 e a resolução de expropriar, aprovada em 16 de Março de 2011, do conselho de administração da EP — Estradas de Portugal, S. A., declaro, no uso da competência que me foi delegada pelo despacho n.º 3334/2010, de 11 de Fevereiro, do Ministro das Obras Públicas, Transportes e Comunicações, publicado no *Diário da República*, 2.ª série, n.º 37, de 23 de Fevereiro de 2010, ao abrigo do artigo 161.º do Estatuto das Estradas Nacionais, aprovado pela Lei n.º 2037, de 19 de Agosto de 1949, a utilidade pública, com carácter de urgência, das alterações às expropriações das parcelas de terreno necessárias à construção deste lanço, abaixo identificadas, com os elementos constantes da descrição predial e da inscrição matricial dos direitos e onus que sobre elas incidem e os nomes dos respectivos titulares.

Mais declaro autorizar a SPER — Sociedade Portuguesa para a Construção e Exploração Rodoviária, S. A., na qualidade de subconcessionária da subconcessão Auto-Estradas do Raio Alentejo, a tomar posse administrativa das mencionadas parcelas, assinaladas nas plantas anexas, com vista ao rápido início dos trabalhos, sendo que a urgência das expropriações se lava no interesse público de que a obra projectada seja executada o mais rapidamente possível.

Os encargos com as expropriações em causa encontram-se cautionados pela SPER — Sociedade Portuguesa para a Construção e Exploração Rodoviária, S. A., nos termos do disposto no n.º 2 do artigo 12.º do Código das Expropriações.

13 de Abril de 2011. — O Secretário de Estado Adjunto, das Obras Públicas e das Comunicações, Paulo Jorge Oliveira Ribeiro de Campos.