



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

EPIDEMIOLOGIA E DIAGNÓSTICO DA BESNOITIOSE BOVINA EM PORTUGAL

HELGA MARLENE CARDOSO WAAP

PRESIDENTE: Reitor da Universidade de Lisboa

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Luís Miguel Martins Lucas Cardoso

Doutor Virgílio da Silva Almeida

Doutora Yolanda Maria Vaz

Doutor José Manuel Alves Correia da Costa

Doutor José Augusto Farraia e Silva Meireles

Doutor José Alexandre da Costa Perdigão e

Cameira Leitão

ORIENTADORA

Doutora Yolanda Maria Vaz

COORIENTADOR

Doutor José Alexandre da Costa Perdigão e

Cameira Leitão

COORIENTADOR

Doutor Hélder Carola Espiguiinha Cortes

2015

LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

EPIDEMIOLOGIA E DIAGNÓSTICO DA BESNOITIOSE BOVINA EM PORTUGAL

HELGA MARLENE CARDOSO WAAP

TESE DE DOUTORAMENTO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
ESPECIALIDADE DE SANIDADE ANIMAL

PRESIDENTE: Reitor da Universidade de Lisboa

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Luís Miguel Martins Lucas Cardoso

Doutor Virgílio da Silva Almeida

Doutora Yolanda Maria Vaz

Doutor José Manuel Alves Correia da Costa

Doutor José Augusto Farraia e Silva Meireles

Doutor José Alexandre da Costa Perdigão e

Cameira Leitão

ORIENTADORA

Doutora Yolanda Maria Vaz

COORIENTADOR

Doutor José Alexandre da Costa Perdigão e

Cameira Leitão

COORIENTADOR

Doutor Hélder Carola Espiguinha Cortes

2015

LISBOA

Ao Mário, ao Luís e ao Pedro

Agradecimentos

Agradeço

à minha orientadora, Prof.^a Yolanda Vaz por ter aceitado orientar-me, por confiar em mim e por me ter introduzido e guiado subtilmente no mundo da epidemiologia,

ao meu co-orientador Doutor Alexandre Leitão os ensinamentos e sábios conselhos ao longo de tantos anos e, muito em especial, a disponibilidade durante a execução deste trabalho,

ao meu co-orientador Prof. Helder Cortes, tudo o que me ensinou e que se revelou tão útil neste e noutros caminhos,

ao meu colega de curso e amigo Telmo Nunes os novos desafios na análise estatística e espacial dos dados, a disponibilidade, as longas horas em frente ao computador e sobretudo a paciência ...

ao meu querido esposo e colega Mário Hilário, todo o apoio na execução deste trabalho, as sugestões e comentários inteligentes, as muitas “boleias” aos soros e por estar sempre disponível para ajudar,

à minha colega e amiga Rita Cardoso toda a simpatia e troca de ideias ao longo destes anos e, espero, também no futuro,

à Dra. Inácia Corrêa de Sá, por me ter proporcionado no passado os meios que me permitiram desenvolver estes e outros trabalhos, pela gentileza e todo apoio que sempre me demonstrou e, especificamente neste trabalho, pela disponibilização dos soros do seu banco de soros,

à minha amiga e colega de laboratório Cristina Inácio, pela amizade e por estar sempre pronta a ajudar,

e, claro, ao departamento de Parasitologia do INIAV, ao Doutor Jacinto Gomes e muito em especial à Lucinda Marques e à D.^a Maria do Carmo Dias, pela grande, grande ajuda com a logística dos soros, pela boa disposição e empenho no trabalho desenvolvido.

Agradeço também,

à DGAV a colaboração neste estudo e a cedência e disponibilização dos dados referentes aos soros colhidos no âmbito do projeto LIFE,

aos laboratórios DRAPN, Segalab, Viseu, Guarda, Alcains, Proleite, LMV, COPRAPEC, Évora, ACOS, Assisvet e DRAALG e, em especial à Dra Carla Afonso e à Eng^a Zulmira Lopes, a preparação e envio das amostras,

ao Dr. Manuel Cardoso (DRAPN), a amizade e apoio que sempre me demonstrou e, em especial neste trabalho, as diligências para o envio dos soros da região Norte e a gentileza de ter divulgado e assegurado as respostas ao questionário nesta região,

à Dra. Ana Paula Figueiras (DSAVRN), ao Dr. António Pina Fonseca (DSAVRC) e à Dra. Ana Caria Nunes (DSAVRLVT), a amabilidade de organizarem e acompanharem as visitas às explorações,

ao Dr. Jorge Francisco Soares, a disponibilização dos soros de espécies silváticas colhidos na Tapada de Mafra,

e a todos os colegas das OPP que colaboraram nas colheitas dos soros, bem como aos colegas que dedicaram parte do seu tempo a responder ao questionário.

Epidemiologia e diagnóstico da besnoitiose bovina em Portugal

Resumo

A besnoitiose bovina, causada por *Besnoitia besnoiti*, é uma doença reemergente na Europa. Neste trabalho, após revisão do conhecimento sobre a epidemiologia, patogenia e diagnóstico, dedicou-se especial atenção ao ciclo de vida e vias de transmissão deste agente. Desenvolveu-se uma técnica serológica de aglutinação direta (B-MAT), com elevada sensibilidade (96,9%) e especificidade (99,7%), validada num rastreio nacional para determinar a prevalência e distribuição geográfica de *B. besnoiti*. Neste rastreio, envolvendo 391 explorações em 83 concelhos, observou-se uma verdadeira prevalência de explorações infetadas de 5,1% e uma prevalência média intraexploração de 33,0% (0,7-72,4%). Por varredura espacial detetou-se um *cluster* no Alentejo, o que está de acordo com as observações clínicas históricas. Um inquérito nacional aos médicos veterinários de campo revelou que apenas 17,5% tinham experiência clínica da doença, maioritariamente no Alentejo. Finalmente, num rastreio serológico de 1297 animais pertencentes a outras espécies domésticas e silváticas pela técnica B-MAT, não se detetou a presença de anticorpos anti-*B. besnoiti*. Considerando a importância económica da doença, a sua divulgação junto dos médicos veterinários e criadores bem como a investigação da sua epidemiologia são fundamentais para apoiar o sector pecuário nacional, sobretudo no Alentejo onde se encontra a maior prevalência serológica e de casos clínicos.

Palavras chave: *Besnoitia besnoiti*, besnoitiose bovina, teste de aglutinação direta, estudo transversal descritivo, questionário

Epidemiology and diagnosis of bovine besnoitiosis in Portugal

Abstract

Bovine besnoitiosis, caused by *Besnoitia besnoiti*, is a re-emergent disease in Europe. In this work, after reviewing the present knowledge on the epidemiology, pathogeny and diagnosis, special attention was devoted to the studies on the life cycle and transmission of this parasite. A direct agglutination serological technique (B-MAT) with a high sensitivity (96.9%) and specificity (99.7%) was developed and validated in a national survey to determine the prevalence and geographic distribution of *B. besnoiti*. The survey covered 391 herds in 83 municipalities. A true herd prevalence of 5.1% and a mean within-herd prevalence of 33.0% (0.7-72.4%) were estimated. Spatial scan statistics identified one cluster in the region Alentejo, which is in agreement with historical clinical data. A national inquiry to veterinary field practitioners showed that only 17.5% had clinical experience of besnoitiosis, the majority in Alentejo. Finally, no anti-*B. besnoiti* antibodies were detected in a B-MAT serological screening of 1297 animals belonging to other domestic and wildlife species. Considering the economic importance of the disease, the dissemination of information among veterinary practitioners and cattle producers as well as extended research on its epidemiology are essential to support the national livestock sector, especially in Alentejo, where the highest serological and clinical prevalence are found.

Key words: *Besnoitia besnoiti*, bovine besnoitiosis, direct agglutination test, cross-sectional study, questionnaire

ÍNDICE

Resumo.....	vii
Abstract.....	viii
Preâmbulo.....	1
Capítulo I - Introdução geral	3
1.1 <i>Aspetos históricos</i>	3
1.2 <i>Classificação taxonómica de B. besnoiti</i>	9
1.3 <i>Morfologia dos quistos, bradizoítos e taquizoítos de B. besnoiti</i>	11
1.4 <i>Distribuição geográfica e dados de prevalência</i>	14
1.5 <i>Transmissão</i>	17
1.5.1 <i>Hipótese de transmissão direta</i>	17
1.5.2 <i>Hipótese de transmissão indireta</i>	19
1.6 <i>Sinais clínicos</i>	28
1.7 <i>Diagnóstico</i>	31
1.8 <i>Tratamento</i>	34
1.9 <i>Vacinação</i>	36
1.10 <i>Prevenção</i>	37
Capítulo II - Revisão sistemática dos estudos para identificação de hospedeiros intervenientes no ciclo de vida de B. besnoiti	39
1. <i>Introdução</i>	39
2. <i>Material e métodos</i>	40
2.1 <i>Revisão sistemática dos estudos para identificação de hospedeiros intervenientes no ciclo de vida de B. besnoiti</i>	40
2.2 <i>Análise crítica dos estudos realizados</i>	41
3. <i>Resultados</i>	41
3.1 <i>Estudos para identificação do hospedeiro definitivo</i>	41
3.2 <i>Estudos para identificação de hospedeiros intermediários</i>	45
3.3 <i>Análise crítica dos estudos relativos ao ciclo de vida de B. besnoiti</i>	48
4. <i>Discussão</i>	49
Capítulo III - Desenvolvimento e otimização de uma técnica de aglutinação direta modificada para diagnóstico da infecção por B. besnoiti (B-MAT).....	55
1. <i>Introdução</i>	55
2. <i>Material e métodos</i>	57
2.1 <i>Origem dos soros utilizados no desenvolvimento da técnica</i>	57
2.2 <i>Produção de taquizoítos de B. besnoiti para as provas de B-MAT e IFI</i>	58
2.3 <i>Prova B-MAT</i>	60
2.4 <i>Prova de Imunofluorescência Indireta</i>	61
2.5 <i>Análise de dados</i>	62
3. <i>Resultados</i>	62
3.1 <i>Isolamento de B. besnoiti</i>	62
3.2 <i>Otimização do teste com soros de referência</i>	63
3.3 <i>Desempenho do B-MAT com soros de campo</i>	63
4. <i>Discussão</i>	65
Capítulo IV - Estudo transversal descritivo	69
1. <i>Introdução</i>	69
2. <i>Material e métodos</i>	70
2.1 <i>Plano de amostragem</i>	70

2.2 Rastreio serológico.....	72
2.3 Inquéritos epidemiológicos nas explorações positivas	73
2.4 Análise de dados	74
3. Resultados	76
3.1 Resultados descritivos.....	76
3.2 Análise bayesiana.....	81
3.3 Análise espacial.....	81
3.4 Visitas e inquéritos epidemiológicos nas explorações seropositivas	82
4. Discussão	87
Capítulo V - Questionário sobre besnoitiose bovina aos Médicos Veterinários	93
1. Introdução.....	93
2. Material e métodos.....	93
3. Resultados	94
4. Discussão	103
Capítulo VI - Rastreio serológico da infeção por <i>B. besnoiti</i> em espécies domésticas e silváticas	105
1. Introdução.....	105
2. Material e métodos.....	106
3. Resultados	107
4. Discussão	111
Capítulo VII - Considerações finais.....	113
Bibliografia	118
Anexo 1.....	133
<i>Espécies e número de animais testados para identificação de potenciais hospedeiros definitivos</i>	<i>133</i>
Anexo 2.....	134
<i>Revisão dos estudos de infeção experimental: nº de espécies testadas, forma parasitária inoculada, dose, sinais clínicos, métodos de confirmação e referências bibliográficas... 134</i>	
Anexo 3.....	139
3.1. Soros analisados por freguesia e concelho na região NUTS 2 Norte.	139
3.2. Soros analisados por freguesia e concelho na região NUTS 2 Centro.	142
3.3. Soros analisados por freguesia e concelho na região NUTS 2 Lisboa.	143
3.4. Soros analisados por freguesia e concelho na região NUTS 2 Alentejo	144
3.5. Soros analisados por freguesia e concelho na região NUTS 2 Algarve.....	145
Anexo 4.....	147
<i>Questionário sobre a besnoitiose bovina.....</i>	<i>147</i>

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Bovino com sinais crónicos de besnoitiose bovina (Berthelon & Labeyrie, 1938). ...4	
Figura 2. A - imagem de corte histológico de quisto de <i>B. bennetti</i> (anteriormente <i>G. leuckarty</i>) (Henry & Masson, 1932); B - corte histológico de <i>B. besnoiti</i> (Besnoit & Robin, 1913); C - corte histológico de macroesquizonte de <i>Eimeria gilruthi</i> (anteriormente <i>G. gilruthi</i>) (Wenyon, 1929).7	
Figura 3. Quistos de <i>B. besnoiti</i> . A- fotografia macroscópica de tecido subcutâneo ampliada; B- corte histológico corado com hematoxilina-eosina (Laboratório Patologia INIAV). . 13	
Figura 4. Taquizoítos de <i>B. besnoiti</i> em cultura de células Vero. 14	
Figura 5. Mapa mundial de distribuição da besnoitiose bovina 15	
Figura 6. Hipóteses de transmissão direta e indireta de <i>B. besnoiti</i> 17	
Figura 7. Quistos na conjuntiva da esclera de um bovino afetado 30	
Figura 8. Representação esquemática da reação de aglutinação direta.57	
Figura 9. Placa de microtitulação com reações positivas e negativas pela técnica de B-MAT65	
Figura 10. Mapa e número de animais amostrados por concelho. 77	
Figura 11. Mapa dos concelhos positivos, número de animais amostrados e representação gráfica da proporção de animais positivos por concelho..... 79	
Figura 12. Histograma da prevalência intraexploração 79	
Figura 13. Títulos B-MAT dos soros positivos pelas técnicas B-MAT e IFI. 80	
Figura 14. A - Distribuições <i>a priori</i> e posteriores da prevalência média intraexploração; B - distribuições <i>a priori</i> e posteriores da prevalência nas explorações. 81	
Figure 15. Distribuição geográfica das freguesias e concelhos amostrados em cada região NUTS 2..... 82	
Figura 16. Percentagem de respostas relativamente ao grau de conhecimento da besnoitiose bovina 94	
Figura 17. Número e distribuição por distrito das respostas relativas ao grau de conhecimento da besnoitiose bovina em Portugal continental (n=70). 95	
Figura 18. Opinião sobre a frequência da besnoitiose bovina, por trimestre do ano..... 96	
Figura 19. Opinião sobre a frequência dos sinais agudos da besnoitiose bovina..... 97	
Figura 20. Opinião sobre a frequência dos sinais crónicos da besnoitiose bovina..... 97	
Figura 21. Nº de respostas relativas às medidas e combinações de medidas adotadas pelos MV (n=10) para a prevenção da besnoitiose bovina. 98	
Figura 22. Distribuição geográfica dos casos clínicos de besnoitiose bovina por concelho. ... 99	
Figura 23. Opinião dos MV (n=14) relativamente à importância económica da besnoitiose bovina, medida numa escala de 1-4..... 100	
Figura 24. Doenças contempladas no diagnóstico diferencial da besnoitiose bovina..... 100	
Figura 25. Opinião sobre a frequência de observação dos sinais clínicos compatíveis com besnoitiose bovina, por trimestre..... 101	
Figura 26. Distribuição geográfica dos concelhos onde foram observados animais com sinais clínicos compatíveis com besnoitiose bovina..... 102	
Figura 27. Mapa dos concelhos de origem dos soros dos porcos, herbívoros silvestres e carnívoros domésticos e silvestres testados para <i>B. besnoiti</i> 110	

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Transmissão mecânica a coelhos e bovinos: nº de animais infetados/ inoculados, nº mínimo e máximo de vetores utilizados e nº mínimo e máximo de transferências, sinais clínicos e método de confirmação da infeção.	24
Tabela 2. Sequência temporal do aparecimento dos sinais clínicos (Bigalke, 1981).	30
Tabela 3. Pontos críticos nos estudos para identificação de potenciais hospedeiros de <i>B. besnoiti</i>	49
Tabela 4. Desempenho do B-MAT em comparação com a IFI, considerando os soros de campo de Portugal, Espanha e França.	64
Tabela 5. Sensibilidade, especificidade e concordância do B-MAT em comparação com a IFI, considerando a totalidade dos soros testados (n=402).	65
Tabela 6. Informação <i>a priori</i> e distribuição de probabilidades para o desempenho dos testes, prevalência de explorações infetadas e prevalência intra-exploração.	74
Tabela 7. Número de explorações e freguesias amostrados e respetivas prevalências (%) por região NUTS2, antes da agregação das explorações ao nível do concelho.	76
Tabela 8. Número de animais, explorações, freguesias e concelhos amostrados e respetivas prevalências (%) por região NUTS2, após agregação das explorações ao nível do concelho.	77
Tabela 10. Seroprevalência de anticorpos anti- <i>B. besnoiti</i> de acordo com o sexo, grupos etários (meses) e tamanho da vacada e respetivos valores-p.	80
Tabela 11. Localização das explorações visitadas, regime de produção, aptidão, tamanho do efetivo, nº de animais testados e prevalências (%) encontradas.	83
Tabela 12. Espécies animais domésticas (n) em contacto com os bovinos nas explorações visitadas.	84
Tabela 13. Espécies animais selvagens em contacto com os bovinos nas explorações visitadas.	84
Tabela 14. Dados de manejo colhidos através do inquérito epidemiológico nas explorações visitadas.	86
Tabela 15. Espécies animais carnívoras testadas para despiste da infeção por <i>Besnoitia</i> spp.	108
Tabela 16. Espécies animais herbívoras e omnívoras testadas para despiste da infeção por <i>B. besnoiti</i>	108
Tabela 17. Origem geográfica dos soros de animais carnívoros testados para <i>B. besnoiti</i>	109
Tabela 18. Origem geográfica dos soros de animais herbívoros testados para <i>B. besnoiti</i> . ..	109

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- B-MAT - *Besnoitia* -Teste de Aglutinação Direta Modificado (*Besnoitia-Modified Agglutination Test*)
- BABS - Tampão Albumina Bovina Salino (*Bovine Albumine Buffered Saline*)
- BVD - Diarreia Viral Bovina (*Bovine Viral Diarrhoea*)
- CDV - Vírus da Esgana (*Canine Distemper Virus*)
- DA - Aglutinação Direta (*Direct Agglutination*)
- DAT - Teste de Aglutinação Direta (*Direct Agglutination Test*)
- DGAV - Direção Geral de Alimentação e Veterinária
- DMEM - Meio Eagle Modificado por Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
- DMSO - Dimetilsulfóxido
- DNA - Ácido Desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic acid*)
- DSAVR - Direção de Serviços de Alimentação e Veterinária Regional
- ELISA - Ensaio Imunoenzimático (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)
- EP - Extratos Pulmonares
- FMV - Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa
- HD - Hospedeiro Definitivo
- HI - Hospedeiro Intermediário
- HSe - Sensibilidade ao nível da exploração (*herd sensitivity*)
- IBR - Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (*Infectious Bovine Rhinotracheitis*)
- IC - Intervalo de Confiança
- IFAT - Teste de Imunofluorescência Indireta (*Immunofluorescent Antibody Test*)
- IFI - Imunofluorescência Indireta
- Ig - Imunoglobulina
- INIAV - Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária
- io - intraocular
- ip - intraperitoneal
- ITS - Internal Transcribed Spacer
- iv - intravenoso
- κ - capa de Cohen
- 2-ME - 2-Mercaptoetanol
- MV - Médico Veterinário

N-MAT - *Neospora*-Teste de Aglutinação Direta Modificado (*Neospora*-Modified Agglutination Test)

NUTS - Nomenclatura de Unidades Territoriais para fins Estatísticos

PBS - Tampão Fosfato Salino (*Phosphate Buffered Saline*)

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase (*Polimerase Chain Reaction*)

PISA - Programa Informático de Saúde Animal

QGIS - Sistema de Informação Geográfica Quantum (*Quantum Geographic Information System*)

SAT - *Sarcocystis*-Teste de Aglutinação Direta (*Sarcocystis*-Agglutination Test)

sc - subcutâneo

Se - Sensibilidade

SFB - Soro Fetal Bovino

SIDA - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

SNIRB - Sistema Nacional de Identificação e Registo de Bovinos

Sp - Especificidade

Preâmbulo

A besnoitiose bovina é provocada por *Besnoitia besnoiti*, um parasita apicomplexa do grupo das coccídeas formadoras de quistos com especial tropismo para a pele e tecido conjuntivo. A sua importância económica é frequentemente associada a prejuízos na produção de carne e peles, infertilidade nos machos, refugio de animais, reprovações no matadouro e mortalidade. A inexistência de tratamento e de vacinas seguras e eficazes, o desconhecimento do seu ciclo de vida, bem como a baixa consciencialização para esta doença, dificultam a implementação de estratégias de prevenção e controlo. A expansão e aumento da incidência da besnoitiose bovina na Europa motivaram a emissão de um parecer sobre a besnoitiose bovina pela EFSA em 2010, classificando-a como doença emergente. Neste parecer é realçada a importância do estudo da epidemiologia da besnoitiose bovina e recomenda-se que o foco da investigação sobre a doença incida no estudo da sua distribuição, mecanismos de transmissão e ciclo de vida. Esta tarefa requer o desenvolvimento de novas técnicas de diagnóstico, sensíveis e específicas, que possam ser eficientemente aplicadas no campo. O estudo da besnoitiose bovina em Portugal, contemplando a prevalência, a distribuição geográfica, os mecanismos de transmissão, o ciclo de vida e a percepção da doença no campo desenvolvido durante este trabalho vai ao encontro das recomendações emitidas a nível europeu e pretende apoiar o sector pecuário nacional, designadamente no que se refere à promoção da detecção precoce e ao combate à expansão da doença.

Neste contexto, os objetivos deste trabalho foram:

- 1) fazer uma avaliação crítica do conhecimento relativo à transmissão e ciclo de vida do parasita, através de uma revisão sistemática da literatura disponível;
- 2) desenvolver uma técnica de diagnóstico serológico adaptada ao rastreio da infeção em bovinos e outras espécies animais;
- 3) determinar a prevalência e distribuição geográfica da infeção por *B. besnoiti* em bovinos em Portugal, utilizando a técnica desenvolvida;
- 4) implementar um questionário aos médicos veterinários para avaliar a sua percepção da besnoitiose bovina no campo e
- 5) avaliar o papel de potenciais hospedeiros definitivos e intermediários, silváticos e domésticos no ciclo de vida de *B. besnoiti*.

O presente trabalho encontra-se dividido em seis capítulos. O capítulo I e II são capítulos de revisão da literatura científica e contêm, respetivamente, uma introdução geral ao parasita e uma revisão sistemática da literatura sobre a sua transmissão e ciclo de vida. Os

capítulos III - V são capítulos de desenvolvimento experimental, e referem-se ao desenvolvimento de uma técnica de aglutinação direta modificada (III), a um estudo transversal descritivo da infeção por *B. besnoiti* em Portugal continental (IV) e ao rastreio serológico da infeção em potenciais hospedeiros domésticos e silváticos. No capítulo VI são apresentadas as considerações finais à tese, que reúnem as principais conclusões dos trabalhos e as perspetivas futuras de investigação na área da epidemiologia da besnoitiose bovina.

Capítulo I - Introdução geral

1.1 Aspetos históricos

A história da besnoitiose bovina foi marcada por uma grande indefinição em relação à nomenclatura do agente e da doença que durou até à segunda metade do século XX. Não sendo conhecido o hospedeiro definitivo, o enigma em torno do ciclo de vida do parasita, apesar dos esforços desenvolvidos ao longo de décadas, mantém-se até hoje.

As primeiras descrições da doença

Embora algumas fontes refiram vagamente o conhecimento da doença na antiguidade, as primeiras descrições provêm do início do século XIX (Cruzel, 1829 [citado por Besnoit & Robin, 1912]; Gellé, 1830; Taiche, 1831; Pradal, 1836; Festal, 1859; Roche-Lubin, 1959; Santin, 1859). A etiologia da doença era então associada a diversos fatores, sobretudo às alterações bruscas da temperatura, às más condições de higiene, ao trabalho intenso e à má alimentação, mas também à ingestão de plantas tóxicas, à prática de sangrias e exutórios na primavera, à estabulação prolongada em ambientes quentes e húmidos, ao mau estado das camas dos animais e às lutas entre touros. Cruzel (1829) foi o primeiro a sugerir a implicação de insetos e de “zoófitos microscópicos” na etiologia da doença. Roche-Lubin (1859) verificou que a enfermidade era rara nas zonas montanhosas e calcárias da região do Midi, França, e Festal (1859) constatou que os animais nas planícies nunca adoeciam, ao contrário dos animais criados nas colinas, associando este facto à maior pobreza do solo nestas áreas que resultava numa má alimentação e maior fadiga dos animais.

Nessa altura conhecia-se apenas a fase crónica da doença. A besnoitiose bovina era designada por anasarca dos bovinos ou elefantíase, devido à exuberância dos sinais clínicos característicos desta fase que faziam lembrar a elefantíase-dos-gregos ou lepra-dos-árabes (provocada por *Mycobacterium leprae*). Outros autores designaram a doença por *phlegmasie cutanée* (Pradal, 1836), *fièvre angioténique* e *maladie rouge* (citados por Berthelon & Labeyrie, 1938). Lafosse (1860) (citado por Berthelon & Labeyrie, 1938) constatou que a elefantíase representava o segundo período de uma doença inflamatória generalizada. Cadéac (1884)¹ (citado por Besnoit & Robin, 1912) foi o primeiro a associar os quadros clínicos das fases aguda e crónica à mesma entidade clínica, confirmando a identidade da elefantíase e da anasarca dos bovinos. Até à descoberta do agente etiológico e durante a primeira metade do século XX, a nomenclatura usada fazia referência ao quadro clínico da doença (Figura 1).

¹ Cadéac, C. (1884). Identité de l'éléphantiasis et de l'anasarque du boeuf. Description de cette maladie. Revue Vétérinaire, 521-540.

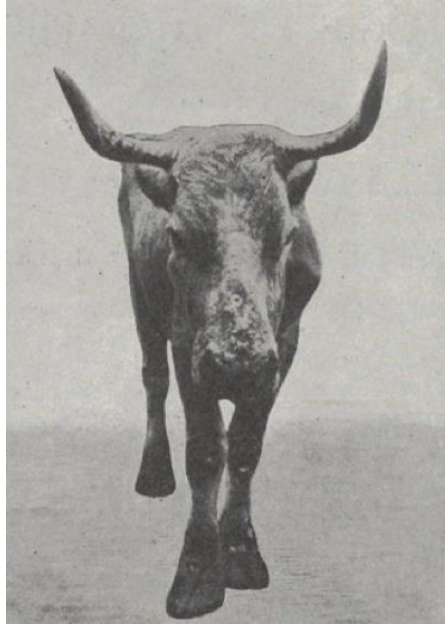


Figura 1. Bovino com sinais crônicos de besnoitiose bovina (Berthelon & Labeyrie, 1938).

Na África do Sul, a besnoitiose bovina era conhecida como *elephant skin disease of cattle*, *olifantsvelsiekte*, *dikvelsie* (Pols, 1960), na Venezuela por *Dermatosis Verrugosa por Globidium* (Vogelsang & Gallo, 1941)² (citado por Alvarez-García, Frey, Mora & Schares, 2013) e o autor brasileiro César Pinto (1944), possivelmente influenciado por Vogelsang e Gallo (1941) referiu-se à doença como “Dermatite Verrucosa bovina” num tratado sobre doenças parasitárias dos animais domésticos.

A descoberta do agente etiológico

Em 1912, Besnoit e Robin publicaram a descoberta de uma enorme quantidade de quistos esféricos contendo inúmeros esporos na pele e no tecido subcutâneo de animais afetados, provenientes dos Pirinéus (Figura 2). Besnoit e Robin (1912) identificaram estes corpúsculos como sarcosporídios, devido às suas semelhanças morfológicas com outras espécies de *Sarcocystis* conhecidas. Ainda no mesmo ano, Marotel (1912)³ (citado por Henry, 1913; Pols 1960) verificou que este parasita nunca tinha sido descrito antes em bovinos e propôs que a espécie fosse designada *Sarcocystis besnoiti*, ficando o nome Besnoit associado à descoberta do agente. Em 1915, Enrico E. Franco, Professor da Faculdade de Medicina e Ildefonso Borges, Professor da Escola de Medicina Veterinária, publicaram na Revista de Medicina Veterinária uma descrição detalhada das observações macroscópicas e histológicas

² Vogelsang, E.G. & Gallo, P. (1941) *Globidium besnoiti* (Marotel, 1912) y habronemosis cutanea en bovinos de Venezuela. Rev. Med. Vet. Parasitol, 3, 153–155.

³ Marotel M (1912) Discussion of paper by Besnoit and Robin. Bull et Mem de la Soc des Sciences Vet de Lyon et de la Soc de Med Vet de Lyon e du Sud-Est 15, 196–217.

feitas em seis casos clínicos de besnoitiose bovina. Estes animais faziam parte de 67 casos rejeitados no matadouro municipal de Lisboa, no período entre 1885 e 1914. Da análise do mapa de reses abatidas e inutilizadas por sarcosporidiose no matadouro, os autores concluíram que os animais de raça alentejana eram os mais afetados,

«[...] porquanto no período referido, em que foram abatidas 339.636 rêses bovinas adultas, observaram-se 56 casos nesta raça (0,164 por 1.000), ao passo que apenas se reconheceram 7 na raça brava ou ribatejana (0,0206 por 1.000) e 4 nos chamados bois ratinhos de raça mirandêsa (0,0117 por 1.000)» (Franco & Borges, 1915, p. 256).

De onde os autores deduziram que, aparentemente,

«[...] só os animais provenientes do Alentejo e Ribatejo contraem a doença, devendo portanto considerar-se indemnes os do Algarve e os de todas as províncias do norte do Tejo» (Franco & Borges, 1915, p. 256).

Franco e Borges (1915, 1916) observaram que as lesões ocorriam sobretudo entre maio e agosto, mas desconhecendo o carácter sazonal da doença, atribuíram este facto à altura do ano em que o gado alentejano concorria ao matadouro de Lisboa. A principal lesão macroscópica observada foi a presença de pequenos grãos relativamente duros, localizados nas aponevroses superficiais e no tecido celular subcutâneo, fazendo lembrar grãos de areia, o que levou o pessoal do serviço de abate a designar a doença por “areias”. Franco e Borges (1915, 1916) registaram também a limitada extensão e importância das lesões cutâneas, que terão passado despercebidas no exame sanitário em vida, notando-se apenas uma ligeira magreza dos animais. Mais especificamente, referindo-se às descrições de Besnoit e Robin (1912), os autores relataram não ter encontrado alterações cutâneas, como alopecia, espessamento ou endurecimento da pele. À luz dos conhecimentos atuais sobre a evolução clínica da besnoitiose, é provável que estes animais se encontrassem já em fase de convalescença e não no início da doença, como os autores admitiam.

Nomenclatura do agente etiológico

Após a descoberta do parasita por Besnoit e Robin (1912), a nomenclatura do agente sofreu várias alterações. Henry (1913) concluiu que o parasita não podia ser classificado como *Sarcocystis*, conforme Marotel (1912) tinha sugerido, nem tão pouco como um esporozoário, uma vez que o interior dos quistos não se encontrava compartimentalizado por septos e os esporos não apresentavam a forma característica dos esporozoários. O autor rejeitou ainda a aproximação aos parasitas *Globidium leuckarti*, descrito por Flesch (1884)⁴ (citado por Henry e Masson, 1932) na mucosa do intestino grosso do cavalo e *Gastrocystis*

⁴ Flesch, M. Sur un protozoaire de la paroi intestinale du cheval. Recueil Zool suisse, 1,459.

(Chatton, 1910) nos ovinos, afirmando que o parasita cutâneo possuía características distintas que o permitiam diferenciar numa análise minuciosa (Figura 2). Baseando-se na intenção do colega Brumpt (1913) de criar o género *Besnoitia* (Brumpt) na 2ª edição do *Précis de parasitologie*, em preparação, sugeriu então o nome *Besnoitia besnoiti* (Marotel, 1913). Em Portugal, Franco e Borges (1915, 1916), observando também características morfológicas que permitiam diferenciar o novo parasita dos géneros *Sarcocystis* e *Gastrocystis*, propuseram igualmente a denominação *Besnoitia*,

«[...] visto esta, como nos diz Henry, já ter sido alvitrada por Brumpt. Portanto o parasita agora descrito nos bois portugueses e o da sarcosporidiose cutânea de Besnoit & Robin, passar-se-iam a denominar *Besnoitia besnoiti* (Marotel, 1912)» (Franco & Borges, 1915, p. 297)

Quatro décadas mais tarde, Jellison (1956)⁵ notou que Brumpt (1913) na 2ª edição do *Précis de Parasitologie* não utilizou o género *Besnoitia*, como Henry (1913) e os autores portugueses tinham assumido, mas sim o género *Gastrocystis* (revisto por Pols, 1960). Por consulta do referido manual, verificámos que Brumpt (1913) designou o parasita por *Gastrocystis besnoiti* e que mais tarde viria a utilizar *Gastrocystis robini* no *Précis de Parasitologie* (1922) e *Globidium besnoiti* no *Précis de Parasitologie* (1936), mantendo a última designação nas edições subsequentes. Franco e Borges (1916) constam como autores do género no *Zoological Record* de 1916 e no *Nomenclator Zoologicus* de Neave de 1939 (revisto por Pols, 1960). Em 1920, Nöller⁶ incorporou o parasita no género *Globidium* (revisto por Pols, 1960; Pellérdy, 1974). O nome *Globidium besnoiti* viria a generalizar-se nas publicações seguintes, figurando em vários tratados de parasitologia/protozoologia até finais dos anos 40 (Wenyon, 1926; Henry & Masson, 1932; Brumpt, 1936; Curasson, 1943; Pinto, 1944; Marotel, 1949). Até à adoção definitiva da nomenclatura de besnoitiose bovina, a indefinição em torno do género resultou em várias designações alusivas ao agente, como *Bovine cutaneous globidiosis*, *Sarcosporidiose cutanée chez bovins*, *Globidiose cutanée du boeuf*, *Huidsarkosporidiose van beeste*, *Huidglobidiose van beeste*, *Huitglobidiose van runderen*, *Hautsarkosporidiose der Rinder*, *Hautglobidiose der Rinder*, *Sarcosporidiose dos bovinos* (revisto por Pols, 1960).

A confusão em torno do género *Globidium*

O género *Globidium* fora atribuído por Flesch (1884) a um parasita identificado em cortes histológicos no intestino delgado de um cavalo. Flesch (1884) designou este parasita por *Globidium leuckarty*. O nome *Globidium* derivou da presença de pequenos glóbulos

⁵ Jellison, W.L. (1956). On the nomenclature of *Besnoitia besnoiti*, a protozoan parasite. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 64, 154-179.

⁶ Nöller, W. (1920). *Globidium* (*Gastrocystis besnoitia*), Prowazek's Handbuch der Pathogenen Protozoen. Leipzig, 2, 919-993.

refrâtes observados pelo autor no interior do quisto. Os quistos eram relativamente grandes e os glóbulos encontravam-se agregados na sua periferia. Smith (1893)⁷ (citado por Pols, 1960), encontrou quistos semelhante com cerca de 300 a 400 µm no intestino delgado de bovinos nos EUA e concluiu que se tratava provavelmente de um sarcosporídeo. Moussu e Marotel (1902)⁸ (citados por Pols, 1960) identificaram quistos de morfologia parecida no abomaso e intestino delgado de ovinos e caprinos, que designaram por *Globidium faurei*. Vários investigadores começavam já a suspeitar que estas estruturas correspondiam a formas evolutivas de *Coccidia* excepcionalmente grandes. Nesta linha de ideias, Marotel (1907)⁹ (citado por Pols, 1960), sugeriu que as formas quísticas observadas no intestino de bovinos em França correspondiam a fases esquizogónicas de *Eimeria zürnii*. Chatton (1910) (citado por Pols, 1960; Péllerdy, 1974; Sénaud, Heydorn & Mehlhorn, 1984), porém, embora também defendesse a aproximação às coccídeas ou gregarinas, designou as estruturas globidiosas encontradas no abomaso e por vezes no intestino dos ovinos por *Gastrocystis gilruthi*, em honra de Gilruth, que já tinha descrito o parasita. Mesnil, Chatton & Pérard (1913) observaram os quistos cedidos por Besnoit e Robin (1912) em cortes histológicos e constataram as suas semelhanças morfológicas com *G. gilruthi*. Henry (1913) e Franco e Borges (1915, 1916), analisaram minuciosamente o parasita e, ao contrário dos seus antecessores, concluíram que possuía características distintas que permitiam diferenciá-lo de *G. gilruthi*, sugerindo que fosse considerado um protozoário particular, para o qual propuseram o nome *Besnoitia besnoiti*.

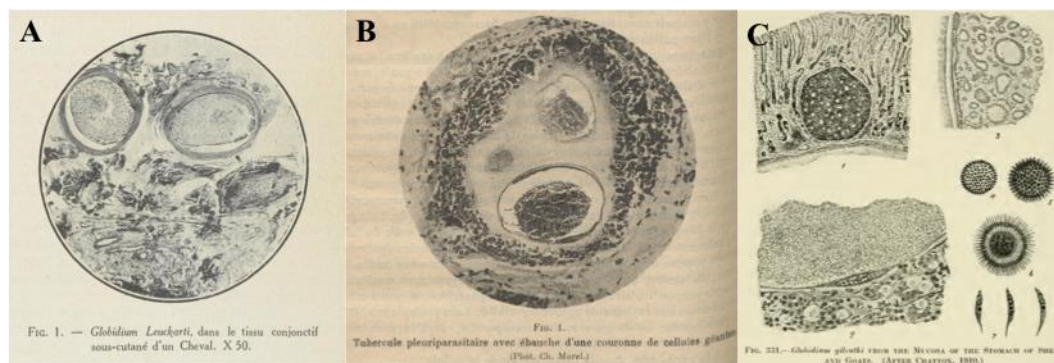


Figura 2. A - imagem de corte histológico de quisto de *B. bennetti* (anteriormente *G. leuckarty*) (Henry & Masson, 1932); B - corte histológico de *B. besnoiti* (Besnoit & Robin, 1913); C - corte histológico de macroesquizonte de *Eimeria gilruthi* (anteriormente *G. gilruthi*) (Wenyon, 1929).

Num curto espaço de tempo verificou-se que, para além dos equinos, caprinos e bovinos, várias outras espécies animais albergavam parasitas globidiformes no tubo digestivo e na pele. Em 1920, Nöller reviu a nomenclatura dos parasitas intestinais *Globidium* (*G. leuckarty* do

⁷ Smith, T. (1893). Preliminary notes on a sporozoan in the intestinal villi of cattle. Bull. U.S. Dept. Agr. Bur. An. Ind., 3, 73-78

⁸ Moussu, G. & Marotel, G. (1902). La coccidiose du mouton et son parasite. Arch. Parasitol., 6, 82-98

⁹ Marotel, G. (1907). Un nouveau sporozoaire intestinal chez le veau. Bull. Soc. Sc. Vet. Lyon, 10, 249-254.

cavalo, *Globidium tatusi* do tatu), *Balbiana mucosa*, *Ileocystis macropodis*, *Lymphocystis macropodis*, *Sarcocystis macropodi*, *Ileocystis vombati* dos marsupiais, *Gastrocystis gilruthi* dos ovinos e caprinos e do parasita descrito por Besnoit e Robin (1912) e inclui-os todos no género *Globidium*, justificando tratar-se de parasitas morfológicamente indistinguíveis. Sem apresentar mais razões, deduziu que as estruturas quísticas encontradas no intestino dos bovinos eram idênticas à forma cutânea e deu-lhes o nome *Globidium besnoiti* (Marotel, 1912) (revisto por Pols, 1960; Pellérdy, 1974).

Henry & Masson (1932), adotando a nomenclatura de Nöller (1920), identificaram estruturas quísticas semelhantes às dos bovinos no tecido cutâneo e subcutâneo de um cavalo em França e, por analogia, concluíram que se tratava do parasita intestinal *Globidium leuckarty*. Segundo os autores, os quistos cutâneos corresponderiam a esquizontes erráticos, resultantes de uma infeção acidental com elementos provenientes do intestino, por via sanguínea, ou cutânea. Bennett (1927)¹⁰ descreveu os quistos cutâneos em cavalos no Sudão (citado por Pols, 1960). Babudieri (1932)¹¹ reviu a ordem Sarcosporidia e verificou que o parasita cutâneo dos bovinos e dos cavalos nada tinha a ver com o parasita intestinal *Globidium*, e sugeriu a sua inclusão no género *Besnoitia*, designando-os respetivamente por *Besnoitia besnoiti* (Marotel, 1912) e *Besnoitia benetti* (Babudieri, 1931) (Pols, 1960). Reichenow e Carini (1936)¹² (revisto por Pols, 1960; Péllerdy, 1974) foram os primeiros a dissolver o género *Globidium*, colocando-o como subgénero de *Eimeria*. Não obstante, a aceitação da nova nomenclatura não foi consensual e o equívoco quanto à localização cutânea e intestinal do parasita *Globidium besnoiti* manteve-se durante anos (Brumpt, 1936; Curasson, 1943; Neveu-Lemaire, 1943; Pinto, 1944; Marotel, 1949). Em 1946, Hammond, Bowman, Davis & Simms¹³ (citados por Pols, 1960; Péllerdy, 1974) demonstraram experimentalmente que os esquizontes gigantes ou globidia intestinais apareciam no ciclo endógeno de *Eimeria bovis*. Reichenow (1953)¹⁴ passou a referir-se ao parasita cutâneo dos bovinos como *B. besnoiti* (Marotel, 1912) e ao parasita intestinal como *Eimeria (Globidium) bovis* (Züblin, 1908) (revisto por Pellérdy, 1974). À semelhança disto, o parasita intestinal dos cavalos passou a ser designado por *Eimeria (Globidium) leuckarty* (Flesch, 1884), sendo provável que as formas observadas por Flesch (1884) fossem macrogâmetas ou oocistos deste parasita (revisto por Pellérdy, 1974). Por sua vez, o parasita encontrado no abomaso dos ovinos foi designado por *Eimeria (Globidium) gilruthi* (Chatton, 1910) (revisto por Pols, 1960), permanecendo até hoje dúvidas relativamente à sua posição taxonómica. Apesar de o nome *B.*

¹⁰ Bennett, S.C.J. (1927). A peculiar equine Sarcosporidium in Anglo Egyptian Sudan. Vet. J., 83, 297

¹¹ Babudieri, B. (1932). Sarcosporidi e le Sarcosporidiosi (Studio monográfico). Arch. F. Protistenk., 76, 423-580

¹² Reichenow, E. & Carini, A. (1937). Über *Eimeria travassoi* und die Gattung *Globidium*. Arch. F. Protistenkunde, 88, 374-386.

¹³ Hammond, D.M. Bowman, G.W., Davis, L.R. & Simms, B.T. (1946). The endogenous phases of the life cycle of *Eimeria bovis*. J. Parasitol., 32, 409-423.

¹⁴ Reichenow, E. (1953). Lehrbuch der Protozoenkunde. 6th ed. Jena: Gustav Fischer Verlag

besnoiti ter sido extensamente adotado nas década de sessenta a setenta (Pols, 1960; Bigalke, 1968; Khvan, 1969¹⁵; Peteshev *et al.*, 1974¹⁶, 1975¹⁷, 1976¹⁸ [citados por Levine & Ivens (1981)]; Rommel, 1975), ainda assim, em 1982, Tadros e Laarman sinonimizaram o género *Besnoitia* com *Isospora*, juntamente com *Toxoplasma gondii* e usaram o nome *Isospora besnoiti*. Esta sinonímia não foi aceite, prevalecendo *B. besnoiti* como nome da espécie e besnoitiose como designação da doença. Desta breve revisão da história da besnoitiose bovina é notável o facto de o parasita cutâneo *B. besnoiti* ter sido englobado em seis géneros (*Sacocystis*, *Besnoitia*, *Gastrocystis*, *Globidium*, *Eimeria* e *Isospora*).

1.2 Classificação taxonómica de *B. besnoiti*

B. besnoiti é uma coccídea formadora de quistos pertencente ao filo Apicomplexa, classe Conoidasida, ordem Eucoccidiorida, família Sarcocystidae, subfamília Toxoplasmatinae e género *Besnoitia* (Levine & Ivens, 1981; Ellis *et al.*, 2000; Tenter, Heckeroth & Weiss, 2000). Os apicomplexa possuem geralmente um organito único, o apicoplasto e um complexo apical, envolvido no processo de invasão da célula hospedeira. Estes protozoários formam esporos e são parasitas obrigatórios dos animais. Todos os membros da classe Conoidasida possuem uma estrutura apical, designada por corpo conóide. A ordem Eucoccidiorida contém as espécies que passam pelas fases de merogonia (assexual), gametogonia (sexual) e esporogonia (formação de esporos) durante o seu ciclo de vida. Os parasitas da família Sarcocystidae são heteróxicos, produzem oocistos com dois esporocistos, cada um com quatro esporozoítos, no intestino do hospedeiro definitivo e os estádios assexuados são encontrados no hospedeiro intermediário. O género *Besnoitia* faz parte da subfamília Toxoplasmatinae, juntamente com *Toxoplasma gondii*, *Neospora* e *Hammondia* (Ellis *et al.*, 2000; Tenter *et al.*, 2000). Esta caracteriza-se pela ausência de merócitos, as formas assexuadas são geralmente transmissíveis entre hospedeiros intermediários e os oocistos esporulam no exterior. O género *Besnoitia* distingue-se dos outros por os merontes se desenvolverem sobretudo nos fibroblastos e por o núcleo da célula hospedeira se encontrar na parede do meronte (Levine & Ivens, 1981).

¹⁵ Khvan, M.V. (1969). *Besnoitia besnoiti* of cattle in Kazakhstan. Prog. Protozool. 3:232-233.

¹⁶ Peteshev, V.M., Galouzo I.G & Polomoshnov. A.P. (1974). Koshki-definitivnye khozyaeva besnoitii (*Besnoitia besnoiti*). Izvest. Akad. Nauk Kazakh. SSR, Ser. Biol. 1:33-38.

¹⁷ Peteshev, V.M., Polomoshnov A.P. & Eshtokina N.V. (1975). [Citellus fulvus as an experimental model for the study of *Besnoitia besnoiti*.] Voprosy Prirodnoi Ochagovosti Boleznei, Alma-Ata, USSR. 7:84-89. (Prot. Abstr. 1:213).

¹⁸ Peteshev, V.M. Polomoshnov, A.P. (1976). [In Russian: The role of wild animals in the circulation of *Besnoitia* in nature] Prirodnoochagovye Antropozoonozy, Tezisy Dokladov k IX Vsesoyuznoi Konferentsii po prirodnoi Ochagovosti Boleznei Cheloveka i Zhivotnykh, Omsk, U.S.S.R. 18-21 Maio 1976, pp 222-223.

Espécies do género *Besnoitia*

Até à data foram descritas 10 espécies pertencentes ao género *Besnoitia*. Seis destas espécies infetam roedores (*Besnoitia akadoni*, *Besnoitia neotomofelis*, *Besnoitia jellisoni*, *Besnoitia wallacei*), lagomorfos (*Besnoitia oryctofelisi*), marsupiais e lagartos (*Besnoitia darlingi*). As restantes espécies foram descritas em ungulados domésticos e silvestres, nomeadamente em bovinos e antílopes (*Besnoitia besnoiti*), renas e boi almiscarado (*Besnoitia tarandi*), caprinos (*Besnoitia caprae*), burros e cavalos (*Besnoitia bennetti*). Frank e Frenkel (1981) encontraram quistos de *Besnoitia* no coração de um lagarto (*Lacerta dugesii*) na Madeira, tratando-se da primeira descrição de besnoitiose num animal poiquilotérmico na África-Eurásia. Os autores concluíram que os quistos correspondiam em tamanho aos de *B. darlingi* encontrados em lagartos (*Basiliscus* e *Ameiva*) no Panamá.

Relativamente ao genoma do parasita, os segmentos publicados, para além de reduzidos em número, são heterogéneos e não permitem uma análise comparativa entre as diferentes espécies. As sequências disponíveis, na sua larga maioria sequências parciais, referem-se aos genes que codificam para o RNA ribossomal 18S, 5.8S e 28S e às regiões ITS (internal transcribed spacer)-1 e ITS-2, que codificam para o domínio I da enolase 2, para a proteína dissulfeto isomerase (PDI), para a cadeia beta da RNA polimerase e o marcador RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA) 25/396. As sequências da região ITS-1 foram publicadas para oito espécies de *Besnoitia* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) acedido Março 2015). Esta região permite diferenciar filogeneticamente as espécies de *Besnoitia* dos pequenos mamíferos das espécies dos ungulados, com uma divergência genética na ordem de 23,1–25,5%. A variabilidade entre os segmentos dos pequenos mamíferos é de 1,6–5,9%, mas nos ungulados, a região ITS-1 não permite discriminar os diferentes isolados ao nível da espécie ou da estirpe (Olias, Schade & Mehlhorn, 2011). Recentemente, foi descrita uma técnica de genotipagem por microssatélites, capaz de distinguir *B. besnoiti* de *B. tarandi* e *B. benetti* (Madubata, Dunams-Morel, Elkin, Oksanen & Rosenthal, 2012). Para além das similaridades genéticas entre as espécies de *Besnoitia* dos ungulados, verificou-se também uma grande semelhança entre o perfil sero-antigénico de *B. besnoiti*, *B. benetti* e *B. tarandi* (Ness *et al.*, 2012; Gutiérrez-Expósito *et al.*, 2012). A sequenciação do genoma de *B. besnoiti* será um passo fundamental para identificar proteínas antigénicas específicas com aplicação no diagnóstico.

Clinicamente, a besnoitiose dos caprinos, renas e equídeos é muito semelhante à besnoitiose bovina, manifestando-se com os sinais típicos de anasarca e esclerodermia (Cousineau, 1967; Wobeser, 1976; Ayroud, Leighton & Tessaro, 1995; Choquette, Broughton, Miller, Gibbs & Dubey *et al.*, 2004, 2005). *B. besnoiti* também foi descrito em antílopes,

nomeadamente no kudu (*Tragelus strepsiceros*), no gnu-azul (*Connochaetes taurinus*) e em impalas (*Aepyceros melanopus*). Nestas espécies, os quistos localizam-se sobretudo nas veias periféricas dos membros e do pescoço, sendo comparativamente raros na pele (McCully, Basson, Van Niekerk & Bigalke, 1966).

Apesar de serem morfológicamente indistinguíveis, os isolados dos bovinos e antílopes têm um comportamento biológico diferente. Nos estudos experimentais realizados, os coelhos infetados com isolados de antílope não apresentaram os sinais cutâneos típicos, nem quistos na pele e as formas proliferativas foram raramente encontradas no sangue. Os bovinos, embora suscetíveis à infeção com isolados de antílope, evidenciaram apenas manifestações ligeiras e não desenvolveram quistos. Todavia, a infeção com estirpes de antílope confere imunidade à infeção com isolados de bovino, tanto nos antílopes, como nos bovinos, indicando uma relação imunológica muito próxima (Bigalke, van Niekerk, Basson & McCully, 1967; Basson, McCully, & Bigalke, 1970). Mais tarde verificou-se que, embora não existam diferenças genéticas entre as regiões ITS-1 dos isolados de bovino e dos gnus (Ellis *et al.*, 2000), a análise de isoenzimas por electroforese permite a sua diferenciação (Le Blancq *et al.*, 1986)¹⁹ (citado por Jacquiet, Liénard & Franc, 2010). No seu conjunto, estes resultados sugerem que os isolados dos bovinos e dos antílopes sejam, na verdade, estirpes diferentes ou variedades biológicas de *B. besnoiti*.

Os aspetos anatomopatológicos da besnoitose dos pequenos mamíferos nos seus hospedeiros naturais foram pouco estudados. A presença de quistos de *B. darlingi*, *B. jellisoni*, *B. oryctofelisi*, *B. akodoni* e *B. neotomofelis* foi descrita em diversos tecidos, incluindo a pele, as serosas, o pulmão, a traqueia, o esófago, o baço, os órgãos reprodutores, os ossos e os músculos (Ernst, Chobotar, Oaksec & Hammond 1968; Smith & Frenkel, 1977; Smith & Frenkel, 1984; Grisard *et al.*, 1997; Venturini *et al.*, 2002; Charles, Ellis, Dubey, Barnes & Yabsley, 2011). Os gatos domésticos, identificados como o hospedeiro definitivo de *B. neotomofelis*, *B. oryctofelisi*, *B. wallacei* e *B. jellisoni*, não apresentaram sinais clínicos significativos associados à infeção (Wallace & Frenkel, 1975; Dubey *et al.*, 2002, 2003; Dubey & Yabsley, 2010).

1.3 Morfologia dos quistos, bradizoítos e taquizoítos de *B. besnoiti*

As formas conhecidas de *B. besnoiti* são os taquizoítos e os bradizoítos contidos em quistos. Peteshev (1974)¹⁶ foi o único a descrever oocistos do tipo *Isospora*, medindo 14,3-

¹⁹ Le Blancq, S.M., Desser, S.S., Shkap, V., Pipano, E., 1986. Besnoitia strain differentiation using isoenzyme electrophoresis. J. Parasitol. 72, 475–476.

15,7 x 11,4-14,3 µm em gatos experimentalmente infetados com quistos de *B. besnoiti*. Uma vez que outros autores, mais tarde, não conseguiram reproduzir esta observação (Rommel, 1975, Diesing *et al.*, 1988; Basso, Schares, Gollnick, Rütten & Deplazes, 2011), presentemente questiona-se se estes oocistos seriam realmente de *B. besnoiti*.

Quistos

Os quistos (Figura 3) de *B. besnoiti*, embora semelhantes aos quistos de *Sarcocystis* ou esquizontes de *Eimeria*, possuem características morfológicas distintas que permitem diferenciá-los das outras coccídeas. Para além de não apresentarem as trabéculas características de *Sarcocystis*, a inclusão do núcleo ou núcleos da célula hospedeira na parede quística é uma característica única do género *Besnoitia*. O diagnóstico morfológico das espécies de *Besnoitia* é difícil, devido à variação do tamanho e da espessura da parede dos quistos que varia em função do hospedeiro, do tropismo para os tecidos e da duração da infeção (Dubey, Shkap, Pipano, Fish & Fritz 2003). Os quistos de *B. besnoiti*, contendo milhares de bradizoítos, têm cerca de 600 µm de diâmetro (Pols, 1960), são esbranquiçados e brilhantes e aglomeram-se frequentemente em cachos. A parede quística apresenta três camadas. A camada interna é apenas visível por microscopia electrónica e corresponde à membrana do vacúolo parasitóforo. A camada intermédia, granular, com cerca de 0,2 µm de espessura, contém o protoplasma e os núcleos da célula hospedeira (Dubey *et al.*, 2003). A camada externa hialina é constituída por lâminas concêntricas de colagénio e matriz amorfa, podendo chegar a um diâmetro total de 1 mm, embora no geral não ultrapasse 0,2 mm (Mehlhorn *et al.*, 2009). A parede externa é um produto da reação do hospedeiro ao parasita (Pols, 1960).

Os quistos propriamente ditos são formados pelas células hospedeiras hipertrofiadas, possivelmente fibroblastos ou histiócitos, contendo o vacúolo parasitóforo (Pols, 1960; Basson *et al.*, 1970). Na imunohistoquímica, os quistos apresentaram reatividade para a vimentina, um componente dos filamentos intermédios presente nas células de origem mesenquimal e foram negativos para MAC-387, um marcador de macrófagos, monócitos e granulócitos (Majzoub *et al.*, 2010). O vacúolo parasitóforo contém os bradizoítos, parasitas degenerados e estruturas vacuolizadas e tubulares (Dubey *et al.*, 2003; Langenmayer *et al.*, 2014).

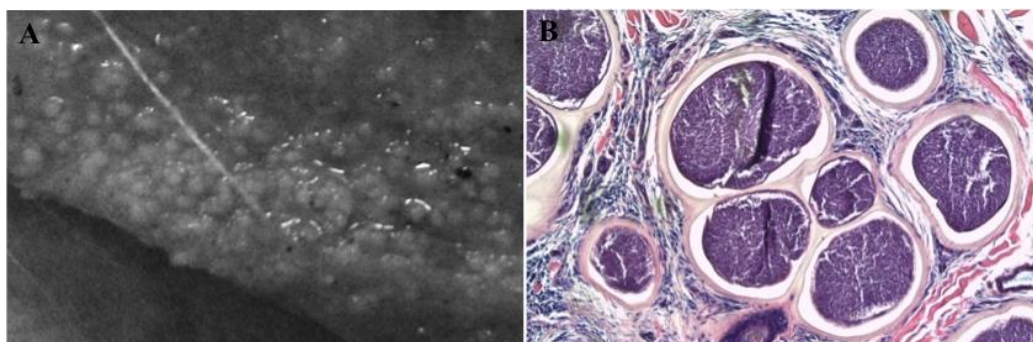


Figura 3. Quistos de *B. besnoiti*. A- fotografia macroscópica de tecido subcutâneo ampliada; B- corte histológico corado com hematoxilina-eosina (Laboratório Patologia INIAV).

Bradizoítos

Os bradizoítos foram extensamente estudados e descritos por microscopia ótica e por microscopia electrónica de transmissão e de varrimento. Os parasitas, em forma de crescente, contêm os organitos comumente encontrados nas outras coccídeas formadoras de quistos. A extremidade anterior, típica do filo apicomplexa, apresenta o complexo apical, formado pelo corpo conóide, o anel polar, as róptrias, os microtúbulos e os micronemas. O anel polar é constituído pela junção das membranas internas do parasita e encontra-se ligado a 22 microtúbulos subpeliculares (Njenga, Bwangamoi, Kangethe, Mugera & Mutiga, 1995; Majzoub *et al.*, 2010). O corpo conóide é uma estrutura retráctil em forma de cone truncado, com estruturas fibrilares dispostas em espiral (Njenga *et al.*, 1995). Os bradizoítos possuem 3-4 pares de ductos de róptrias, com aproximadamente 0,2 μm de diâmetro, que se alongam até ao nível do núcleo do parasita. Os micronemas são numerosos (até 70) e estendem-se posteriormente, embora sejam mais abundantes na porção anterior do parasita (Njenga *et al.*, 1995; Dubey *et al.*, 2003). Os micronemas e as róptrias têm funções secretoras com importância no processo de invasão celular. O núcleo encontra-se na porção posterior e ocupa cerca de metade da largura do parasita. Os bradizoítos apresentam ainda grânulos densos, corpos lipídicos e grânulos de amilopectina, estes geralmente posteriores ao núcleo (Njenga *et al.*, 1995; Dubey *et al.*, 2003). Quanto ao tamanho, as medições variam ligeiramente entre os autores: 7,0 x 2,0 μm (Pols, 1960), 6,0-7,5 x 1,9-2,3 μm (Dubey *et al.*, 2003), 4,6-1,8 μm (Cortes *et al.*, 2003), 7-8 x 2,0 μm (Majzoub *et al.*, 2010), 7-9 x 2,0 μm (Mehlhorn *et al.*, 2009). Ao contrário de outras espécies de *Besnoitia*, *B. besnoiti* aparentemente não possui corpos enigmáticos (Dubey *et al.*, 2003; Majzoub *et al.*, 2010).

Taquizoítos

Os taquizoítos (Figura 4) apresentam as mesmas estruturas que os bradizoítos e as medições variaram entre 5,0-9,0 x 2,0-5,0 µm (Pols, 1960) e 6,0-7,5 × 2,5-3,9 µm (Reis *et al.*, 2006). O núcleo é central e os grânulos de amilopectina são em menor número.

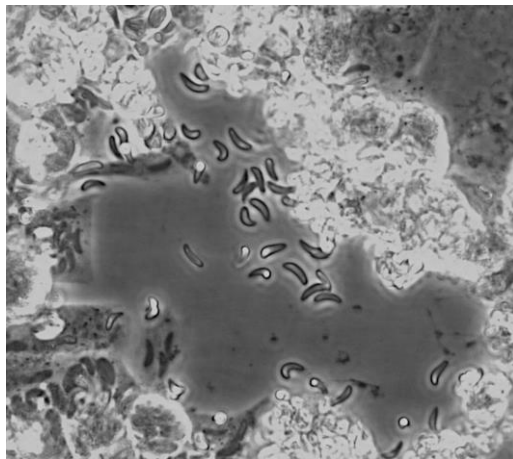


Figura 4. Taquizoítos de *B. besnoiti* em cultura de células Vero.

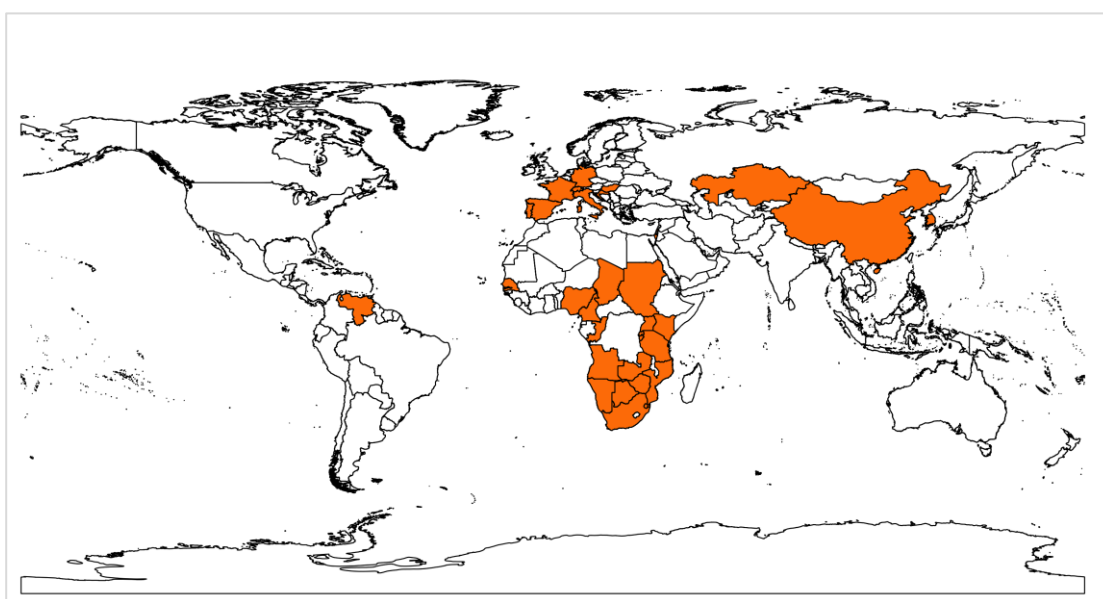
1.4 Distribuição geográfica e dados de prevalência

Às descrições da doença no sul de França e País Basco no século XIX e princípio de século XX (Besnoit e Robin, 1912), seguiram-se os relatos de Franco e Borges (1915, 1916), assinalando a existência da doença em Portugal desde 1885, em animais oriundos do Alentejo. A difusão dos primeiros trabalhos pela comunidade científica e a inclusão do novo parasita em vários tratados de Parasitologia e Protozoologia entre os anos 20 e 40 (Wenyon, 1926; Neveu-Lemaire, 1943; Curasson, 1943; Marotel, 1949), geraram uma onda de relatos de casos na África-Eurásia (Figura 5). Em África, a doença foi diagnosticada pela primeira vez no Sudão (Benett, 1927) (citado por Pols, 1960), seguindo-se a África do Sul, onde passou a ser considerada endêmica, com uma área de distribuição que cobria parte do nordeste do país (antigo Transvaal), incluindo o Bushveld, e se estendia para sul, para o atual Free State (revisto por Pols, 1960; Bigalke, 1968). Nos anos seguintes, as descrições de besnoitiose bovina sucederam-se praticamente por toda a África subsaariana. Os casos mais recentes foram diagnosticados no Zimbawe em 2013 (Chatikobo, Chogab, Ncubec & Mutambara, 2013). Na Ásia, as primeiras descrições datam de 1932, na Coreia do Sul (Fukushima, 1932)²⁰ (citado por Lee, Bak, Moon & Shin, 1970), onde foi considerada enzoótica (Lee *et al.*, 1970). A besnoitiose foi posteriormente reportada na China (Er-Hsiang, 1957), no Casaquistão

²⁰ Fukushima, T. & Issiki, O. (1932). An additional report on globidiosis of cattle. J. Chuo. Vet. Med, 12, 953-958

(Khvan, 1969)¹⁵ e em Israel (Neuman, 1972; Goldman & Pipano, 1983). Existe apenas um relato da América do Sul (Vogelsang & Gallo, 1941) (citado por Alvarez-García *et al.*, 2013) e até à data não foram diagnosticados casos na América do Norte e na Austrália. Os dados de prevalência fornecidos são escassos e os valores indicados muito variáveis. Os primeiros estudos epidemiológicos basearam-se na observação dos quistos na esclera ou na pele dos animais. Bigalke (1968) detetou quistos na esclera de 8,5% dos animais examinados (n=5018), dos quais, 17,3% apresentavam sinais clínicos. Herin (1952) descreveu uma prevalência de cerca de 2% nos animais examinados no antigo Ruanda-Urundi.

Figura 5. Mapa mundial de distribuição da besnoitiose bovina



Europa - Alemanha (Mehlhorn *et al.*, 2009; Shares *et al.*, 2009), Croácia (Beck *et al.*, 2013), Espanha (Fernandez-García *et al.* 2009, 2010; Alvarez-García *et al.*, 2014, Gutiérrez-Expósito *et al.*, 2014), França (Juste *et al.*, 1990; Bordeau *et al.*, 2004; Alzieu *et al.*, 2007; Liénard *et al.*, 2011), Húngria (Hornok *et al.*, 2014), Itália (Agosti *et al.*, 1994; Gollnick *et al.*, 2010; Gentile *et al.*, 2011; Manuali *et al.*, 2011), Portugal (Franco e Borges, 1915, 1916; Leitão, 1949; Malta & Silva, 1991; Cortes *et al.* 2003; 2005; 2006; Meireles *et al.*, 2014), Suíça (Lesser *et al.*, 2012); Ásia - Casaquistão (Bucheve *et al.*, citado por Wobeser, 1976²¹; Khvan, 1969¹⁵), China (Er-Hsiang, 1957), Coreia do Sul (Lee *et al.*, 1970), Israel (Neuman, 1972; Goldman & Pipano, 1983); África - África do Sul (revisto por Pols, 1960; Bigalke, 1968; Janitschke *et al.*, 1984); Angola (Leitão, 1949), Botswana (revisto por Pols, 1960), Burundi (revisto por Levine e Ivens, 1981), Camarões (Bigalke, 1981), Chad (revisto por Olias *et al.*, 2011), Congo (revisto por Levine e Ivens, 1981), Moçambique (Ferreira *et al.*, 1982), Namíbia (revisto por Pols, 1960), Sudão (revisto por Pols, 1960; Hussein & Haroun, 1975), Nigéria (revisto por Igbokwe, Abba & Nwagbara, 2009; Sambo *et al.*, 2007; Sambo, Ibrahim, Esievo, & Kazeem, 2014), Quênia (Njagi, Ndarathi, Nyaga & Munga, 1998), Rwanda (revisto por Pols, 1960; Herin, 1952), Senegal (Thiéry & Mémery, 1961); Swazilândia (Bigalke, 1981), Tanzânia (revisto por Olias *et al.*, 2011), Uganda (Bwangamoi, 1968²², [citado por Levine e Ivens, 1981]), Zâmbia (revisto por Levine e Ivens, 1981), Zimbabwe (Bigalke, 1981; Chaticobo *et al.*, 2013); América do Sul - Venezuela (Vogelsang & Gallo, 1941 [citado por Alvarez-García *et al.*, 2013).

²¹ Buchev, K., Uvaliev, I., Omarov, K., Glebova, N., Lopatnikov, G. & Samoilov, N. (1964). Besnoitia infection of cattle in the Pre- Balkash area. *Veterinariya*, 41, 317-319.

²² Bwangamoi, O. (1968). Besnoitiosis and other skin diseases fo cattle (*Bos indicus*) in Uganda. *American Journal of Veterinary Research*, 29, 737-743.

Khvan (1969)¹⁵ reportou a infecção em aproximadamente 50% das explorações bovinas no sul e sudoeste do Casaquistão.

Já com recurso às técnicas de diagnóstico serológico, Neuman (1972) e Goldman & Pipano (1983) descreveram prevalências entre 50% e 56,3% em Israel e Janitschke, de Vos & Bigalke (1984) reportaram uma seroprevalência de 72% na África do Sul. Em consequência da expansão dos casos no continente africano e na Ásia, a besnoitiose bovina passou a ser considerada uma doença essencialmente tropical e subtropical, reemergindo na Europa somente na última década do século XX, quase em simultâneo em França, Espanha, Itália e Portugal.

Em França, a doença expandiu-se aparentemente dos Pirinéus para o Maciço Central e Alpes franceses e vários surtos esporádicos foram descritos em regiões a oeste e sudoeste (Bordeau *et al.*, 2004; Alzieu, Dorchies, Schelcher & Gottstein, 2007; Jacquiet *et al.*, 2010, Liénard *et al.*, 2011). Em Espanha, a besnoitiose bovina afeta presentemente algumas regiões no centro do país, estendendo-se a nordeste para os Pirinéus. Na região de Navarra observou-se uma prevalência de 16% em bovinos de carne. No sul, foram detetados casos em Cádiz (Juste, Cuervo, Marco & Oregui, 1990; Fernández-García *et al.*, 2009, 2010; Alvarez-García *et al.*, 2014; Gutiérrez-Expósito *et al.*, 2014). Em Portugal, depois das descrições de Franco & Borge (1915, 1916), não se registaram casos durante décadas, com exceção de uma nota de Leitão (1949), referente a animais provenientes de Angola. A besnoitiose bovina viria a ser novamente diagnosticada no final da década de 80, no Alentejo (Malta & Silva, 1991) e desde aí, o número de casos e explorações infetadas tem vindo a aumentar, atingindo atualmente vários concelhos desta região. Os primeiros casos a norte do Tejo foram diagnosticados já no curso deste trabalho, em 2014, no distrito de Castelo Branco (Meireles *et al.*, 2014). Na Itália, o primeiro foco nos anos 90 foi associado a animais importados de França (Agosti, Belloli, Morini & Vacirca, 1994). Os casos autóctones viriam a ser diagnosticados mais tarde, nos Apeninos do Norte (Gollnick, Gentile & Schares, 2010; Gentile *et al.*, 2012) e na região centro (Manuali *et al.*, 2011). Num estudo serológico realizado no sul de Itália determinou-se um prevalência individual de 44,1% e uma prevalência de explorações infetadas de 83,0% (Rinaldi *et al.*, 2012). Na Alemanha, registou-se apenas um surto na Baviera, em 2008, associado à importação de animais de França (Mehlhorn *et al.*, 2009). O padrão de expansão e aumento de incidência na Europa, motivou a sua classificação como doença emergente em 2010 (EFSA, 2010). A besnoitiose é hoje considerada endémica em Itália, França, Espanha e Portugal. A doença foi ainda diagnosticada na Suíça (Lesser *et al.*, 2012), em animais importados de França e da Alemanha. Mais recentemente, reportaram-se os primeiros casos

na Húngria (Hornok, Fedák, Baska, Hofmann-Lehmann & Basso, 2014) e na Croácia (Beck *et al.*, 2013).

1.5 Transmissão

O modo de transmissão da besnoitiose bovina em condições naturais 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 (Figura 6).

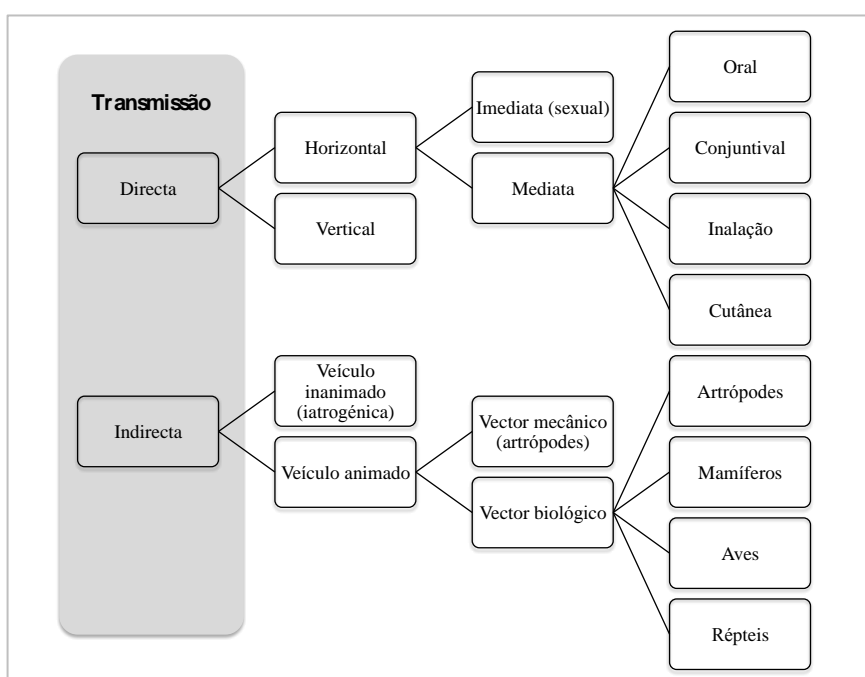


Figura 6. Hipóteses de transmissão direta e indireta de *B. besnoiti*.

1.5.1 Hipótese de transmissão direta

A transmissão direta, pressupõe que o agente causador da doença seja transmitido por contágio, ou seja, por um mecanismo de transferência entre os animais infetados e suscetíveis, na ausência de um veículo ou vetor. 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 contexto da besnoitiose bovina, a transmissão por contacto físico é pouco provável, sobretudo, devido ao seu carácter sazonal. A exposição das formas infetantes contidas nos quistos, embora 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 nunca foi demonstrada e esta teoria tem sido rejeitada por vários autores, em particular, porque a doença também ocorre em explorações que utilizam a inseminação artificial. Num estudo recente em França, a pesquisa de DNA de *B. besnoiti* no sémen de 29 touros infetados, 12 dos quais com manifestações clínicas de besnoitiose bovina foi negativa (Esteban-Gil *et al.*, 2014). Todavia, a infeção intranasal de bovinos com bradizoítos mostrou que *B. besnoiti* consegue atravessar a barreira mucosa (Bigalke, 1968). Assim, admitindo que os quistos presentes na mucosas dos animais podem romper durante a cobrição, a hipótese de transmissão sexual requer mais estudos.

A via transplacentária não parece ser um mecanismo importante na transmissão, dado que a infeção congénita foi reportada uma única vez, num feto abortado no Uganda (Bwangamoi, 1968) (citado por Tradós e Laarman, 1982).

Quanto a outras possibilidades, uma vez que os quistos nas mucosas são muito mais superficiais que na pele, é provável que rebentem ocasionalmente, em especial nos animais mais afetados, libertando os bradizoítos. A disseminação sob a forma de gotículas poderia então constituir uma fonte de infeção para outros animais, por via nasal, conjuntival, oral ou através de soluções de continuidade da pele e das mucosas. Neste cenário, a transmissão teria que processar-se rapidamente, em virtude de a viabilidade dos bradizoítos no exterior do organismo ser muito curta. Todas estas hipóteses carecem até hoje de sustentação experimental.

Independentemente da via de contágio, a transmissão direta implica que os animais infetados na exploração sejam fonte de infeção para os animais coabitantes suscetíveis. Todavia, nos primeiros estudos de coabitação, a ausência de sinais clínicos nos animais coabitantes e na sua descendência, levou os autores a concluir que a doença não era contagiosa (Festal, 1859; Santin, 1859). Quase um século mais tarde, Berthelon e Labeyrie (1938) seguiram algumas explorações afetadas ao longo de dois anos e verificaram que a doença ocorria sazonalmente (desde o início da primavera até ao inverno) nas explorações afetadas, especialmente nos animais recém-introduzidos. Por outro lado, nas explorações indemnes, a besnoitiose aparecia após a introdução de um animal novo, propagando-se sucessivamente a todo o efetivo, apenas com alguns dias de intervalo. Com base nestas informações, os autores concluíram que a doença era contagiosa, que os animais doentes

continuavam a eliminar o agente causal e que este persistia nas explorações. Estas observações viriam a ser contraditadas mais tarde por Pols (1960). Para avaliar a hipótese de contágio, Pols (1960) manteve animais doentes em contacto com animais suscetíveis sob as mesmas condições de acesso a água e alimentação, durante um período de dez anos. Como nenhum dos animais evidenciou sinais clínicos de besnoitiose bovina, Pols (1960) concluiu que a coabitação não contribuía para a transmissão. Mais tarde, Bigalke (1968) viria a demonstrar precisamente o contrário, que a coabitação é essencial para a transmissão do parasita e que ocorre a distâncias muito curtas.

1.5.2 Hipótese de transmissão indireta

A transmissão indireta implica a transferência dos agentes patogénicos para os hospedeiros suscetíveis por meio de um veículo animado ou inanimado. Para que esta forma de transmissão possa ocorrer, é essencial que os agentes consigam sobreviver fora do organismo do hospedeiro durante um certo 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 é iatrogénica, quando resulta do próprio procedimento médico, ocorrendo frequentemente através da reutilização de agulhas contaminadas.

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

Primeiros ensaios de infeção experimental

Os primeiros ensaios foram conduzidos por Besnoit e Robin (1912) e Franco e Borges (1915, 1916). Os autores tentaram, sem êxito, infetar bovinos com suspensões de quistos administradas por via subcutânea e intramamária e através do implante de fragmentos de pele contendo quistos. De igual modo, todas as tentativas de infetar coelhos, ratos e ratinhos por via oral e subcutânea foram mal sucedidas. Os trabalhos levados a cabo por Cuillé, Chelle & Berlureau (1936) viriam a constituir um primeiro ponto de viragem no estudo da transmissão da doença. Constatando o fracasso em reproduzir a doença a partir de animais com infeções crónicas, os autores tentaram transmitir a doença na fase aguda, febril. Com efeito, a administração de 100-1000 ml de sangue colhido de um animal em fase aguda induziu os sinais clínicos típicos de besnoitiose nos bovinos inoculados. No entanto, embora a

reprodução experimental da doença tenha provado que o parasita circulava no sangue na fase febril, Cuillé *et al.* (1936) não conseguiram detetar o parasita no sangue. Mais tarde, Pols (1960) reproduziu com sucesso os trabalhos de Cuillé *et al.* (1936), utilizando sangue de animais na fase febril e, ao contrário dos seus antecessores, demonstrou a presença de formas parasitárias no sangue de um dos animais, 11 dias pós-inoculação. Pols (1960) registou ainda o aparecimento dos quistos na pele 23-34 dias pós- infecção. Para avaliar a utilidade dos modelos animais no estudo da doença, o autor inoculou várias espécies animais (roedores e coelhos) com sangue de bovino contendo as formas proliferativas do parasita por via parentérica, demonstrando que os coelhos são altamente suscetíveis à infecção. De modo a cumprir os postulados de Koch, Pols (1960) inoculou um bovino com o sangue de um dos coelhos infetados. O animal desenvolveu febre e manifestações ligeiras de besnoitose e 23 dias pós-inoculação apresentava quistos na pele. Com estes trabalhos provou-se que as formas proliferativas (taquizoítos) do parasita circulantes no sangue na fase aguda da doença são infetantes por via parentérica e que a doença reproduzida é idêntica à infecção natural. A transmissão através de um vetor artrópode surgia então como uma possibilidade e carecia de estudos mais aprofundados.

Hipótese de transmissão através de um vetor artrópode

Muitos agentes patogénicos são transmitidos através de artrópodes hematófagos. O vetor é biológico, quando o agente se reproduz ou multiplica no artrópode antes de ser transferido para os hospedeiros suscetíveis e mecânico, quando o artrópode se limita a transmitir o agente fisicamente de um hospedeiro para o outro. Na transmissão mecânica, os agentes ficam geralmente retidos nas peças bucais do artrópode durante a refeição no hospedeiro, sendo transmitidos a outro hospedeiro na próxima refeição. Esta forma de transmissão é apenas possível durante um curto espaço de tempo, ao fim do qual o agente é inativado. A transmissão mecânica e biológica não são mutuamente exclusivas, podendo as duas formas de transmissão coexistir. A aptidão de um vetor para transmitir os agentes a outros hospedeiros suscetíveis num dado local e num dado momento é medida pela capacidade vetorial. Esta depende da interação entre o vetor, o agente patogénico e o hospedeiro, bem como das características inerentes ao próprio vetor.

A possibilidade de transmissão do parasita através de insetos já fora adiantada por Cruzel (1829) (citado por Besnoit & Robin, 1912), muito antes da descoberta do agente. Besnoit e Robin (1912) sugeriram que os quistos podiam rebentar e libertar periodicamente os parasitas na corrente sanguínea, mantendo a parasitémia no estado crónico. Todavia, as primeiras publicações contraditórias relativamente à ocorrência da doença em condições de

coabitação e as diversas tentativas infrutíferas de transmitir as formas quísticas do parasita por via parentérica desviaram a atenção da hipótese de transmissão mecânica. McCully *et al.* (1966), ao notar a presença de quistos no sistema vascular periférico dos bovinos e, em especial nos antílopes, onde são raros na pele, retomaram a teoria de Besnoit e Robin (1912) e consideraram que a rotura dos quistos nas paredes dos vasos sanguíneos podia servir de fonte de organismos viáveis para um vetor mecânico ou biológico. Todavia, uma vez que a parasitemia nunca foi demonstrada na fase crónica da doença, Pols (1960), baseando-se nos achados de Cuillé *et al.* (1936), considerou que os parasitas podiam ser transmitidos através de artrópodes hematófagos, na fase aguda. No entanto, opondo-se a esta teoria, a curta duração do período febril restringia as hipóteses de transmissão mecânica. Igualmente, dado o baixo número de casos agudos em dado momento, mesmo nos picos de incidência sazonais, ficava por explicar a sobrevivência do parasita durante o período inter-epizoótico e o aparecimento dos primeiros casos clínicos. A existência de um reservatório animal surgia assim como a hipótese mais lógica, sendo os bovinos na fase crónica, os únicos candidatos conhecidos. Pols (1960) sugeriu que os vetores teriam de estar idealmente munidos de peças bucais capazes de penetrar a derme dos bovinos e romper os quistos, considerando os tabanídeos os candidatos ideais, devido à robustez do seu aparelho bucal. Bigalke (1968) repetiu as experiências de infeção experimental com as formas quísticas e, pela primeira vez, demonstrou que a inoculação parentérica das formas latentes do parasita induzia a infeção em bovinos e coelhos. A infeção, impercetível no exame clínico, uma vez que os animais não manifestavam sinais de anasarca ou esclerodermia, foi diagnosticada através da observação de quistos na esclera e imunidade à reinfeção. Em investigações subsequentes, Bigalke (1968) verificou que as infeções subclínicas representavam a maioria dos casos naturais nas zonas enzoóticas. A prova de que as formas quísticas eram transmissíveis e o predomínio de infeções subclínicas em condições naturais, abriram portas à reinvestigação dos estudos de coabitação. De facto, ao reproduzir o estudo de Pols (1960), nas mesmas instalações, Bigalke observou que a coabitação dos animais com besnoitiose crónica com animais suscetíveis tinha resultado numa transmissão de quase 100% (39/40). Também aqui o diagnóstico foi feito pela observação de quistos na esclera e imunidade à reinfeção, dado que nenhum dos animais apresentava manifestações clínicas. O não reconhecimento dos casos de infeção subclínica aparecia então como a única explicação plausível para a discrepância entre os resultados dos estudos de coabitação realizados por Bigalke (1968) e Pols (1960) e as observações relatadas por outros autores. Outro dado importante foi o facto de a transmissão se confinar quase exclusivamente aos animais em contacto direto com os bovinos doentes. Para o autor, isto era um forte indício de que a doença se propagava a distâncias relativamente curtas. Estas

observações, aliadas à sazonalidade da doença nos meses mais quentes do ano, sugeriam a presença de um artrópode hematófago no ciclo de transmissão da doença. Bigalke (1968) considerou que a transmissão mecânica era o mecanismo que melhor se adaptava às condicionantes de confinamento e sazonalidade. Embora não excluísse a possibilidade de transmissão cíclica através de um hospedeiro artrópode ou vertebrado, a transmissão mecânica funcionava melhor a curtas distâncias devido à rápida perda de infecciosidade dos agentes.

No seguimento deste raciocínio, Bigalke (1968) demonstrou experimentalmente que a transmissão mecânica entre coelhos e bovinos é possível através de tabanídeos (*Atylotus nigromaculatus*, *Tabanocella denticornis*, e *Haematopota albihirta*), glossinas (*Glossina brevipalpis*) e moscas de estábulo (*Stomoxys calcitrans*). No entanto, embora os coelhos manifestassem sinais típicos de besnoitiose, a infecção não teve expressão clínica nos bovinos, levando apenas à formação de alguns quistos na pele dos animais. A presença ou ausência de infecção foi exaustivamente confirmada através do exame clínico dos animais inoculados, da pesquisa de formas proliferativas em esfregaços de sangue preparados na fase febril, da pesquisa de quistos, da inoculação experimental e da imunidade à reinfeção. Bigalke (1968) demonstrou também que os mosquitos da espécie *Culex simpsoni* conseguiam captar os parasitas da pele dos animais infetados, mas não os transmitiam. A viabilidade do parasita nas moscas e tabanídeos foi de curta duração: < 3h nas glossinas, < 24h nos tabanídeos e apenas 1 hora em *S. calcitrans*, sendo, assim, pouco provável que estes artrópodes consigam transmitir *B. besnoiti* a longas distâncias. Os estudos realizados mostraram também que o potencial de transmissão depende da espécie de artrópode envolvida (Tabela 1). Nas experiências com tabanídeos foi apenas necessário um exemplar e 18 transferências dador-recipiente para transmitir a infecção com sucesso entre coelhos. Já no caso dos bovinos foram necessários 2 exemplares e 3 transferências dador-recipiente. A transmissão de *B. besnoiti* através de glossinas foi conseguida com 3-9 exemplares e 15-28 transferências nos coelhos e 8-9 exemplares e 30-107 transferências nos bovinos. Nas experiências com moscas de estábulo, a utilização de 870 moscas e 60 transferências produziu sinais clínicos nos coelhos e as restantes experiências resultaram na infecção subclínica dos animais. A infecção dos bovinos foi conseguida com 2175 moscas e 167 transferências, perfazendo um total de 145725 picadas.

O elevado número de picadas necessário para induzir a infecção no animal recipiente sugere que a transmissão de *B. besnoiti* através de artrópodes hematófagos esteja associada a condições climáticas favoráveis a uma elevada densidade de artrópodes, capazes de transmitir *B. besnoiti*. De facto, o padrão de sazonalidade dos casos clínicos de besnoitiose bovina, entre a primavera e o outono, coincide com o picos de maior atividade dos insetos. Todavia, num

estudo recente, Liénard *et al.* (2011) não conseguiram estabelecer uma relação clara entre os picos de seroconversões e títulos de anticorpos e a atividade das moscas de estábulo, em bovinos leiteiros infetados com *B. besnoiti*, numa zona enzoótica de França. Apesar destes resultados, Liénard *et al.* (2013) reforçaram as observações de Bigalke (1968), demonstrando, através de técnicas de diagnóstico molecular e imunofluorescência direta, que as moscas *Stomoxys calcitrans* conseguiam ingerir bradizoítos de *B. besnoiti* a partir de bovinos com infeções crónicas e transmiti-los mecanicamente para um receptor artificial.

Num outro estudo realizado em duas áreas de pastoreio de grande altitude nos Pirinéus, endémicas para besnoitiose bovina, verificou-se que os tabanídeos se alimentavam preferencialmente de bovinos e veados, em detrimento de outras espécies (javali, cavalos, ovinos, caprinos, corços e camurça dos Pirinéus), reforçando o potencial papel dos tabanídeos como vetores mecânicos da besnoitiose bovina (Baldacchino, Gardès, De Stordeur, Jay-Robert & Garros, 2014). Relativamente ao surto de besnoitiose bovina na Alemanha em 2008, Scharr (2012), num trabalho entomológico realizado na exploração foco, concluiu que os tabanídeos *Haematopota pluvialis* e *Tabanus bromius* e as moscas *Musca autumnalis* e *Stomoxys calcitrans* reuniam os requisitos de abundância, preferência de hospedeiros e período de atividade diurna necessários para poderem ser considerados potenciais vetores de *B. besnoiti*. Outros candidatos poderão no entanto ser procurados entre o leque de dípteros hematófagos prevalentes nas áreas de distribuição da besnoitiose bovina, incluindo culicídeos, psicodídeos, ceratopongonídeos, simulídeos, tabanídeos e moscas picadoras. É possível que estejam envolvidas várias espécies em simultâneo na transmissão do parasita.

No Casaquistão, Kvhan (1969)¹⁵ observou que os bovinos contraíam infeções no inverno, portanto num período de baixa atividade dos dípteros e sugeriu as carraças como potenciais vetores. Por outro lado, os organismos libertados espontaneamente nas secreções dos animais infetados poderão também ser transmitidos de forma passiva através de artrópodes não hematófagos, como a *Musca domestica* (Bigalke, 1968). Nos estudos de infeção experimental com vetores artrópodes verificou-se que a eficiência da infeção dos animais receptores parece depender da densidade dos quistos cutâneos e da antiguidade da infeção dos animais dadores (Bigalke, 1968).

A via iatrogénica foi ensaiada em 2 coelhos. Para tal, Bigalke (1968) introduziu uma agulha de 20G a uma profundidade de 3-4 mm na pele de dois coelhos dadores, picando de seguida a pele dos animais receptores. Este processo foi repetido cinco vezes. Ambos os coelhos desenvolveram sinais típicos de besnoitiose após um período de incubação de 27-34 dias que foi mais longo, portanto, do que o período de incubação nas experiências com

vetores artrópodes (6-15 dias). A infecção foi confirmada através de esfregaços sanguíneos e da imunidade à reinfeção.

Tabela 1. Transmissão mecânica a coelhos e bovinos: nº de animais infetados/ inoculados, nº mínimo e máximo de vetores utilizados e nº mínimo e máximo de transferências, sinais clínicos e método de confirmação da infecção.

Vetor	Nº animais Infet./inoculados	Nº transferências	Nº artrópodes	Sinais clínicos	Método confirmação
Glossinas	7/11 coelhos	15-28	3-9	Reação febril/sinais típicos/ morte	Esfreg.+ , quistos+, inoc. exper.+ , imun. reinf +.
	4/4 bovinos	30-107	8-29	Reação febril, sinais ligeiros	Esfreg.-, quistos+, inoc. exper.+ , imun. reinf.+
Tabanídeos	5/12 coelhos	1-28	1-4	Reação febril, sinais típicos	Esfreg.+ , quistos+, inoc. exper.+ ,
	4/5 bovinos	3-45	2-6	Reação febril, sinais agudos inespecíficos	Esfreg.-, inoc. exper.+ , quistos+
<i>Stomoxys</i>	3/13 coelhos	60-130	870-2250	Reação febril/ sinais típicos	Esfreg.+ , quistos.+ ,
	1/1 bovinos	167	2175	Reação febril	Esfregaço-, quistos+, inoc. exper.+

Transmissão por meio de um ciclo biológico

Barrairon (1939) defendia a transmissão indireta do parasita e apontou os bovinos em fase de esclerodermia e os animais curados como fonte de contágio. Segundo este autor, os parasitas enquistados na derme não seriam diretamente infetantes, mas os seus “esporos” podiam ser ingeridos por outro hospedeiro intermediário (de natureza desconhecida) e evoluir no seu organismo para uma nova forma infetante.

B. besnoiti é uma coccídea formadora de quistos. Regra geral, o ciclo de vida destes parasitas é heteroxeno, desenvolvendo-se em dois hospedeiros. A fase sexuada do ciclo ocorre no predador (hospedeiro definitivo-HD) e o ciclo assexuado na presa (hospedeiro intermediário-HI), normalmente um herbívoro. O HD elimina oocistos depois de ingerir os quistos nos tecidos dos HI e o HI infeta-se por ingestão dos oocistos no solo. Não sendo exceção, todas as espécies de *Besnoitia*, cujo ciclo é conhecido, são heteroxenas, sendo o ciclo do tipo predador-presa mantido entre mamífero-mamífero ou réptil-mamífero (Matuschka, & Häfner, 1984). O gato foi identificado como HD de *B. oryctofelisi*, *B. darlingi*, *B. wallacei* e *B. neotomofelis* e os HI são pequenos mamíferos, incluindo roedores, marsupiais, lagomorfos e lagartos (Wallace and Frenkel, 1975; Dubey *et al.*, 2002, 2003; Dubey and Yabsley, 2010). No ciclo réptil-mamífero, descrito para uma espécie desconhecida de *Besnoitia*, o HD são 4 espécies de víboras (*Bitis arietans*, *Bitis caudalis*, *Bitis gabonica*, *Bitis*

nasicornis) e os hospedeiros intermediários vários roedores (Matuschka, & Häfner, 1984). As espécies de *Besnoitia* dos ungulados foram estudadas ao longo de um século, mas os HD nunca foram identificados, permanecendo em aberto se a fase sexuada existe. Relativamente a *B. besnoiti*, Peteshev *et al.* (1974)¹⁶ indicaram o gato como HD, mas outros autores não conseguiram reproduzir o ciclo (Rommel, 1975; Diesing *et al.*, 1988; Basso *et al.*, 2011). Várias espécies de ruminantes e pequenos mamíferos, em especial os coelhos, são experimentalmente suscetíveis a *B. besnoiti*, mas os bovinos e presumivelmente algumas espécies de antílopes são os únicos hospedeiros naturais conhecidos.

Alguns autores sugeriram que os bovinos podem não fazer parte do elo de transmissão e desempenhar apenas um papel secundário, como HI acidental (Olias *et al.*, 2011). Nesta hipótese, assume-se a existência de um ciclo predador-presa na natureza, em que os bovinos intervêm apenas por acidente, presumivelmente pela ingestão de oocistos no solo. Os animais envolvidos neste ciclo poderão ser apenas espécies silváticas, ou haver uma sobreposição entre os ciclos domésticos e silváticos. Assim, o HD terá que ser procurado entre o leque de mamíferos domésticos/silváticos carnívoros, aves de rapina e répteis conhecidos nas áreas de distribuição da besnoitiose bovina e o HI entre os pequenos mamíferos, aves e répteis intervenientes na cadeia alimentar dos potenciais HD. O vetor artrópode pode sobrepor-se a este ciclo, transmitindo a infecção entre os vários hospedeiros. No caso de *T. gondii*, sabe-se que a ingestão de oocistos pelos HI está associada a formas clínicas mais graves de toxoplasmose que a ingestão dos quistos. Por seu lado, a infecção com oocistos de *N. caninum* é responsável por surtos de aborto, tanto nas explorações indemnes, como nos efetivos infetados. Por analogia, a infecção subclínica poderá estar associada à transmissão horizontal dos bradizoítos, menos virulentos e/ou veiculados em pouca quantidade nas peças bucais dos vetores e a doença à ingestão de oocistos, eliminados por um HD com um biótopo específico, coincidente com as áreas de ocorrência de besnoitiose bovina.

No capítulo II é feita uma revisão sistemática da literatura relativamente aos trabalhos realizados ao longo do último século para esclarecer o ciclo de vida de *B. besnoiti*.

1.6 Fatores de risco

Raça

Hofmeyr (1945)²³ (citado por Pols, 1960) referiu a ausência da doença em bovinos de leite na África do Sul e os primeiros estudos serológicos em Israel (Frank, Klinger & Pipano, 1970; Goldman e Pipano, 1983) mostraram uma maior seroprevalência nos animais de

²³ Hofmeyr, C. F. B. (1945). Globidiosis in cattle. Journal of the South African Veterinary Medical Association, 16, 102-109.

aptidão carne. Bigalke (1968) mencionou que a doença parecia ser mais comum na raça Afrikaner. Curiosamente, citando Martinho (1955)²⁴, o autor aludiu à possibilidade de a raça Afrikaner descender de cruzamentos de animais importados no séc. XV de Portugal e Índia para a África do Sul e, também, que fora sugerido que esta raça derivava da raça Alentejana. Todavia, os trabalhos realizados posteriormente levam a crer que não existe predisposição de raça. Pensa-se hoje que a maior incidência observada nos animais de aptidão carne se deve às diferentes condições de manejo e não a uma maior suscetibilidade das raças. A criação dos animais em extensivo e a prática do pastoreio em comum favorecem a disseminação da doença, quer por um maior contacto entre os animais, quer por uma maior exposição a artrópodes e/ou animais silváticos possivelmente envolvidos no ciclo. De fato, recentemente detetaram-se veados e corços serologicamente positivos junto aos Pirinéus, indicando que estas espécies poderão ser HI de *B. besnoiti* (Gutiérrez-Expósito *et al.*, 2012). Contudo, dada a possibilidade de reação cruzada com outros apicomplexa, são necessários mais estudos para esclarecer estes achados. Por outro lado, o aumento do número de casos nas raças de carne poderá estar associado à intensificação da criação de animais de engorda e à importação de animais de raça limousine e charolesa infetados, oriundos de França, com o intuito de melhorar a produtividade das raças autóctones de carne (Álvarez-García *et al.*, 2013).

Idade

A idade mostrou ser um fator de risco da besnoitiose bovina. Nos estudos serológicos realizados verificou-se que a seroprevalência aumenta com a idade dos animais (Janitschke *et al.* 1984; Fernández-García *et al.*, 2010). A associação com a idade poderá refletir a progressão da infeção no efetivo ao longo de meses ou mesmo anos, uma vez que a probabilidade de os animais se infetarem aumenta ao longo do tempo. 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)²⁵, 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, Pipano, Marcus & Krigel, 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. Num estudo de campo envolvendo 4725 animais, realizado em 6 distritos da Coreia do Sul, Lee *et al.* (1970) verificaram que a percentagem de animais com quistos na esclera era mais elevada nos animais com 5-8 anos

²⁴ Martinho, J.P. (1955). Contribuição para o estudo da origem do bovino Aficânder. Bolm. Soc. Estud. Moçamb., 91.

²⁵ Bigalke, R.D. & Schoeman, J.H. (1967). An outbreak of bovine besnoitiosis in the Orange Free State, Republico f South Afrika. JI S. Afr. Vet. Med. Ass., 33, 21-27

(10-12%), seguido da categoria >9 anos (7-11%) e mais baixa nos animais com 2-4 anos (3-8%). No entanto, a percentagem de casos de esclerodermia foi maior na categoria de 2-6 anos. Em França, o maior número de casos foi registado em animais com 2-4 anos (Alzieu *et al.*, 2007).

Sexo

Goldman e Pipano (1983) observaram uma tendência para títulos serológicos mais altos nos machos. Bigalke (1968) não encontrou diferenças entre géneros relativamente à incidência clínica num estudo envolvendo 427 animais positivos. Alguns autores em França sugeriram uma maior suscetibilidade à doença e maior mortalidade nos machos, mas outros indicaram precisamente o contrário (revisto por Jacquiet *et al.*, 2010). No geral, os estudos indicam que ambos os sexos são igualmente suscetíveis à doença (Bigalke & Prozesky, 2004).

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, Mueller, Majzoub, Schares & Gollnick, 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).

Fatores climáticos

As alterações climáticas verificadas globalmente poderão estar relacionadas com o aumento da incidência da doença, ao favorecer a transmissão mecânica durante os meses mais quentes, coincidentes com os picos de maior atividade dos vetores. 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.

1.6 Sinais clínicos

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

Fase aguda

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 infecção experimental com insetos hematófagos. A febre é o primeiro sinal clínico. A temperatura retal pode atingir 40-42°C e manter-se durante 2 a 10 dias, estando associada à multiplicação dos taquizoítos.

Basson *et al.* (1970) observaram que durante esta fase *B. besnoiti* provoca alterações degenerativas e necróticas, vasculite e trombose, em especial nas pequenas e médias veias, mas também nalgumas artérias. Estas lesões são responsáveis pelos edemas, alterações degenerativas e mesmo infarte, em especial ao nível dos testículos e da pele. A pirexia é acompanhada de inapetência progressiva, com anorexia completa nos casos graves e perda de peso. Os animais deslocam-se lentamente e preferem o decúbito. Nesta fase, apresentam frequentemente fotofobia, epífora, corrimento nasal, paragem da ruminação e aumento da frequência cardíaca e respiratória, podendo também ocorrer abortos. O predomínio de sinais inespecíficos torna o diagnóstico difícil, podendo a doença ser confundida com doença respiratória dos bovinos, febre catarral maligna, ehrlichiose, babesiose, fotossensibilidade aguda e insuficiência cardíaca, devido à acumulação de líquidos nas pernas e regiões ventrais (Bigalke & Prozesky, 2004; Alzieu *et al.*, 2007). Poucos dias a seguir ao aumento da temperatura, em especial nos animais de pelagem clara, observa-se hiperémia do focinho, pele periorbital e escroto. Os edemas surgem com a progressão da doença, variando, desde ligeira tumefação do focinho, espessamento das pregas da pele do pescoço, dorso e tórax, até edema subcutâneo generalizado (anasarca). Muitas das vezes, revelam-se apenas pela acumulação dos fluidos nas zonas ventrais (barbela, esterno, prepúcio, membros), podendo mesmo passar despercebidos. 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 no curso da fase aguda. Os sinais agudos passam muitas vezes despercebidos no campo. A transição para a cronicidade pode ser abrupta, com desaparecimento dos sinais clínicos agudos por volta da terceira semana (Tabela 2), ou gradual (Bigalke & Prozesky, 2004).

Fase crónica

A fase crónica corresponde à fase de formação de quistos nos tecidos dos animais. Estes podem ser encontrados na derme, trato respiratório superior, tecido conjuntivo, conjuntiva da esclera (Figura 7), músculos, mucosa vulvar e ocasionalmente no baço, fígado e músculo cardíaco. Os sinais clínicos mais evidentes são o espessamento e pregueamento progressivos da pele. Estes sinais podem ser localizados ou generalizados. Três a quatro semanas após o início da febre, os animais apresentam um engrossamento marcado das pernas, com movimento difícil e doloroso. Nesta fase observa-se alopecia progressiva, dermatite com hiperqueratose e formação de crostas. Partes da epiderme desprendem-se da pele, deixando áreas acinzentadas, alopécicas e seborreicas. A formação de calosidades é comum ao nível das proeminências ósseas e nas porções ventrais do escroto. Por vezes, surgem fissuras profundas entre as pregas de pele (quadril) e ao nível das proeminências ósseas, frequentemente infestadas com larvas de moscas. As lesões cutâneas podem ser confundidas com dermatofilose, sarna sarcóptica, pediculose, intoxicação por mercúrio, naftalenos clorados e ervilhaca (*Vicia villosa*), paraqueratose (Bigalke & Prozesky, 2004; Alzieu *et al.*, 2007) e fotossensibilidade. Os animais apresentam geralmente linfadenopatia superficial. Nos casos graves observa-se corrimento nasal mucopurulento com formação de crostas ao nível das narinas, dificultando a respiração (estridor). Os sinais clínicos são geralmente acompanhados de hipertermia ligeira, ondulante, durante várias semanas, diminuição do apetite e emaciação. Nos casos graves observa-se anorexia e hipertermia acentuada, por vezes com morte do animal. Os machos ficam aspermatogénicos devido à orquite severa e persistente, seguida de atrofia testicular uni ou bilateral e induração. Os quistos começam a ser visíveis a olho nu na conjuntiva da esclera (Figura 7) e mucosa nasal, 6-7 semanas após a subida inicial da temperatura (Tabela 2).



Figura 7. Quistos na conjuntiva da esclera de um bovino afetado

Apesar de a maioria dos animais sobreviver, o período de convalescença é longo. Nos casos graves, a esclerodermia e alopecia persistem, embora se verifique uma melhoria gradual da aparência dos animais (Bigalke & Prozesky, 2004).

Tabela 2. Sequência temporal do aparecimento dos sinais clínicos (Bigalke, 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
Crônica	Alopecia	25
	Esclerodermia	25-35
	Linfadenopatia	29
	Quistos visíveis na conjuntiva da esclera	36

Mortalidade e morbidade

Nas áreas enzoóticas e epizoóticas, a infecção encontra-se largamente disseminada pela população bovina, mas a proporção de animais que manifesta sinais clínicos é comparativamente baixa (Pols, 1960; Bigalke, 1968; Legrand, 2003; Bourdeau *et al.*, 2004; Cortes *et al.*, 2006b; Alzieu *et al.*, 2007). Nas explorações afetadas, observa-se geralmente uma pequena proporção de animais com manifestações clínicas, uma percentagem maior de

animais subclínicos, com quistos visíveis na conjuntiva da esclerótica, e um predomínio de animais infetados sem sinais clínicos (Pols, 1960; Bigalke, 1968; Goldman e Pipano, 1983). Quando os primeiros casos clínicos são diagnosticados nas explorações, muitas vezes, a prevalência já é bastante elevada (>30%) (Meireles *et al.*, 2014; Berhault, 2008). Nas áreas enzoóticas do sudoeste de França, constatou-se uma prevalência anual de casos clínicos de cerca de 1-10%, com uma incidência de 2% a 5% (Legrand, 2003). Já nas áreas de emergência da doença, os sinais clínicos foram detetados em 15% a 20% dos animais recém-infetados (Jacquiet *et al.*, 2010). Num surto em Espanha, 90,5% dos animais foram identificados como serologicamente positivos, mas apenas 43,0% apresentavam sinais clínicos (Fernández-García *et al.*, 2010). Embora não existam dados concretos, a mortalidade é geralmente baixa <10% (Pols, 1960).

1.7 Diagnóstico

A evolução do diagnóstico laboratorial da besnoitiose bovina

Na ausência de outros recursos laboratoriais, os primeiros casos de besnoitiose bovina foram diagnosticados exclusivamente pela observação dos sinais clínicos de anasarca, esclerodermia, alopecia e seborreia. Com os avanços na histologia no final do século XIX, marcados pelo desenvolvimento de técnicas de coloração histoquímica, meios de inclusão e micrótomos (Titford, 2006), Besnoit & Robin (1912) e Franco & Borges (1915; 1916) descreveram a presença de estruturas quísticas em cortes histológicos do tecido cutâneo e subcutâneo de animais afetados, que identificaram como sarcosporídios. A vulgarização da histopatologia permitiria, no curso da primeira metade do século XX confirmar a doença em diversos países da África, Ásia e Médio Oriente. Durante este período, os progressos no desenvolvimento de métodos de diagnóstico alternativos foram diminutos e pouco acrescentaram ao estado do conhecimento da besnoitiose bovina. Embora a presença de quistos nos cortes histológicos possibilitasse o diagnóstico definitivo da doença, a histopatologia não se adequava a estudos epidemiológicos, devido à dificuldade na recolha (biópsia) e processamento das amostras e sobretudo, devido à fraca sensibilidade na identificação de animais subclínicos. Assim, a falta de instrumentos de diagnóstico, a morbilidade relativamente baixa e a confusão com outras afeções cutâneas, contribuíram para que a besnoitiose bovina se mantivesse oculta nas explorações afetadas. No final do século XIX, Durham e Gruber (Durham, 1895) descreveram a aglutinação específica (aglutinação de agentes patogénicos pelo soro de animais imunizados contra eles) e o seu valor no diagnóstico. Ainda em 1895, este teste foi aplicado por Widal no diagnóstico da febre tifóide

(revisto por Olopoenia & King, 2000). A serologia, como ciência, começaria a afirmar-se na comunidade científica em 1901, com a identificação dos grupos sanguíneos pelo imunologista Karl Landsteiner (revisto por Weatherall, 2011).

A serologia veio também revolucionar o diagnóstico laboratorial em Medicina Veterinária, ao aumentar substancialmente a sensibilidade, especificidade e rapidez do diagnóstico, sendo até hoje considerada o instrumento de eleição no estudo epidemiológico das doenças. Todavia, o desenvolvimento de técnicas serológicas para o diagnóstico da besnoitose bovina demorou vários anos.

O primeiro teste serológico utilizado foi o Sabin-Feldman dye test (Frenkel, 1953²⁶) (revisto por Janitschke *et al.*, 1984). Este teste tinha sido desenvolvido por Sabin e Feldman em 1948, constituindo na época um grande avanço no diagnóstico da toxoplasmose. No entanto, Frenkel (1953) utilizou taquizoítos de *B. jellisoni* como antigénio e os resultados não foram satisfatórios (revisto por Janitschke *et al.*, 1984). Mais tarde, Krasov & Omarov (1975)²⁷ (revisto por Janitschke *et al.*, 1984) utilizaram taquizoítos de *B. besnoiti* para desenvolver as provas de hemaglutinação, imunodifusão e fixação de complemento. Contudo, embora obtivessem resultados positivos com soros de bovinos, os autores constataram a ocorrência de reações cruzadas com *T. gondii*. Nas décadas de 1960-1970, a capacidade de ligar antigénios ou anticorpos a substâncias repórteres fluorescentes e cromogéneas abriu a porta ao desenvolvimento de uma bateria de novos ensaios sorológicos, como a imunofluorescência, o Western blot, o imunoblot, a ELISA, etc., mais sofisticados, e com ganho em termos de sensibilidade e especificidade. Estes testes passaram a substituir amplamente as técnicas de laboratório tradicionais no diagnóstico da besnoitose bovina.

A possibilidade de propagar o parasita em culturas de tecidos (Bigalke, 1962)²⁸ (citado por Bigalke, 1968) foi um marco importantíssimo no diagnóstico, ao assegurar a produção de antigénio em quantidades suficientes para o desenvolvimento e aplicação nas provas serológicas. Inicialmente, o parasita era isolado em animais de laboratório, nomeadamente no coelho (Bigalke & Naudé, 1962²⁹ [citado por Bigalke, 1968]; Bigalke, van Niekerk, Basson & McCully 1967) e no gerbilo (Neuman, 1962³⁰ [citado por Bigalke, 1968]; Shkap, Pipano & Greenblatt, 1987a) e só depois era propagado em diversas linhas celulares. Shkap *et al.* (1987a) demonstraram que as células Vero (células de rim de macaco verde), L929

²⁶ Frenkel, J.K. (1953). Infections with organisms resembling *Toxoplasma*, together with the description of a new organism: *Besnoitia jellisoni*. *Atti VI. Congresso Internazionale di Microbiologia*, 5, 426-434.

²⁷ Krasov, V.M. & Omarov, Z.K. (1975). Koprozy besnoitiza zhivotnykh, *Veterinarya, Moscov*, 2, 65-67.

²⁸ Bigalke, R.D. (1962). Preliminary communication on the cultivation of *Besnoitia besnoiti* (Marotel, 1912) in tissue culture and embryonated eggs. *J. Afr. Vet. Assoc.* 33, 523-532.

²⁹ Bigalke, R.D., & Naude, T.W., 1962. The diagnostic value of cysts in the scleral conjunctiva in bovine besnoitiosis. *J S Afr Vet Assoc.* 33, 21-27.

³⁰ Neuman, M. (1962). The experimental infection of the gerbil (*Meriones tristrami shanii*) with *Besnoitia besnoiti*. *Refuah Veterinarith*, 19, 184-188.

(fibroblastos de ratinho) e BEK (células renais de feto bovino) são altamente suscetíveis à infecção. Cortes *et al.* (2006a) conseguiram o primeiro isolamento *in vitro* do parasita, diretamente a partir dos tecidos de um bovino infetado. Ao evitar o uso de animais de laboratório, este procedimento passou a ser comumente adotado para isolamento de *B. besnoiti* (Fernandez-Garcia *et al.*, 2009a; Schares *et al.*, 2009; Gentile *et al.*, 2012).

Em 1970, Frank *et al.* descreveram a IFI para o diagnóstico da infecção por *B. besnoiti*. Esta técnica tem sido largamente utilizada desde aí (Goldman & Pipano, 1983; Shkap, Reske, Pipano, Fish & Baszler, 2002; Cortes *et al.*, 2006b; Schares *et al.*, 2010), sendo hoje considerada uma prova serológica de referência no diagnóstico da besnoitiose bovina (Schaes *et al.*, 2013). Nas diluições *cut-off* utilizadas (1:200 ou 1:256) não se verificam reações cruzadas com *N. caninum* e *T. gondii* (Shkap *et al.*, 2002; Schares *et al.*, 2010). No entanto, a interpretação da fluorescência é por vezes problemática e a decisão do resultado depende do operador.

A técnica de ELISA, outra prova de referência no diagnóstico da besnoitiose bovina, tem vindo a ser aperfeiçoada desde a década de 80 (séc. XX) (Janitschke *et al.*, 1984; Shkap, Ungar-Waron, Pipano & Greenblatt, 1984; Cortes *et al.*, 2006b; Fernández-García *et al.* 2010; Jacquiet *et al.*, 2010; Schares *et al.*, 2010, 2011a, 2013; Liénard *et al.*, 2011; García-Lunar *et al.*, 2013) e está disponível comercialmente (INGEZIM BES 12.BES.K1 INGENASA, PrioCHECK Besnoitia Ab V2.0 e ID Screen Besnoitia indirect IDVET). Cortes *et al.* (2006b) propuseram uma combinação de ELISA e Western blot. As provas de imunoblot desenvolvidas à base de taquizoítos ou bradizoítos mostraram uma concordância quase perfeita com a IFI (Schaes *et al.*, 2010).

Diversos autores recomendaram o Western blot como teste de confirmação (Cortes *et al.*, 2006b; Schares *et al.*, 2010, 2011; Millán *et al.*, 2012; García-Lunar *et al.* 2013). Num ensaio inter-laboratorial para comparação de diferentes técnicas de ELISA, IFI e Western blot, todas mostraram um elevado desempenho e concordância, embora se tenha confirmado a superioridade do Western blot (García-Lunar *et al.*, 2013).

Apesar das vantagens evidentes, as provas serológicas apresentam algumas limitações, relacionadas sobretudo com a especificidade (Nasir, Lanyona, Schares, Malcolm Anderson & Reichel, 2012) e a janela de diagnóstico, ou seja, o tempo entre a infecção e a seroconversão. De facto, num ensaio inter-laboratorial confirmou-se a falta de sensibilidade dos testes disponíveis no diagnóstico da infecção aguda (García-Lunar *et al.*, 2013). Igualmente, as provas de detecção do agente, como a PCR convencional e a PCR em tempo real mostraram ser mais sensíveis no diagnóstico das infeções recentes do que as técnicas serológicas (Schaes *et al.*, 2011b). A técnica APure-BbELISA, desenvolvida por Schares *et al.* (2013)

com antígeno de *B. besnoiti* purificado por afinidade, detetou a seroconversão nos animais com infecções agudas 7-8 dias após o aumento da temperatura, não mostrando diferenças significativas das técnicas de IFI e imunoblot à base de taquizoítos ou bradizoítos. A PCR em tempo real, pelo contrário, permitiu diagnosticar a infecção 1-3 dias após o início da febre (Schaes *et al.*, 2013). Alguns estudos sugerem que a carga parasitária nos tecidos dos animais pode estar correlacionada com os resultados serológicos. Schares *et al.* (2013) compararam os resultados das PCR em biópsias de pele ou mucosa vaginal com os resultados obtidos por ELISA (APure-BbELISA) e verificaram que a sensibilidade da APure-BbELISA aumentava nos animais com cargas parasitárias mais elevadas. A comparação das leituras da IFI com a PCR em tempo real mostrou resultados semelhantes (Schaes *et al.*, 2011b; 2013). Por outro lado, nalguns animais, mesmo nos que apresentam sinais clínicos, os níveis de anticorpos produzidos podem estar abaixo do limiar de detecção das provas serológicas (Fernández-García *et al.* 2010; Schares *et al.*, 2010; García-Lunar *et al.*, 2013). Assim, nos animais de grande valor ou com suspeita de se encontrarem na fase aguda, recomenda-se que a serologia seja completada com a PCR, utilizando sangue (fase aguda) ou biópsias da mucosa vaginal (fase crónica), de forma a aumentar a sensibilidade do diagnóstico (Schaes *et al.*, 2011b). Não obstante, no caso de suspeita clínica, a besnoitiose bovina pode também ser diagnosticada por métodos mais simples, que incluem a observação dos quistos patognomónicos na esclera, presentes em cerca de 50% dos animais infetados (Bigalke, 1968) e a preparação de esfregaços a partir de raspagens da conjuntiva das esclera (Sannusi, 1991) ou das mucosas (Rostaher *et al.*, 2010).

1.8 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.

[...] *Le grand bon sens de ces hommes est de varier la nourriture de leurs bestiaux, de les mener avec douceur, de les exercer avec ménagement, en un mot, de les aimer; aussi, jamais ces animaux ne sont malades* » (Festal, 1859, p.54).

As sangrias eram realizadas pela maioria dos veterinários, embora na altura já houvesse alguma relutância à sua prática. As sangrias impunham-se como primeira medida na fase inicial edematosa da doença (podendo chegar a 10-20 L ao longo do tratamento) e eram seguidas da administração de purgativos (sulfato de sódio, magnésio), eméticos (sal nítrico) e banhos de vapores emolientes. Em detrimento das sangrias, alguns autores exaltavam os

benefícios do oximel, das fricções resolutivas com vinagre e sabão, das fumigações (à base de menta, zimbro, salva, loureiro) e das fomentações. Nos casos mais resistentes, recorria-se a tisanas diuréticas à base de plantas medicinais, como a gilbardeira (*Ruscus aculeatus*), a parietária (*Parietaria officinalis*) ou a raiz de morangueiro. Caso nenhuma destas medidas melhorasse a condição dos animais, utilizavam-se meios mais drásticos, como as escarificações e os populares exutórios da barbela, preparados com drenos ou troquiscos impregnados com a raiz de heléboro negro (*Helleborus niger*), macerada em vinagre ou ácido sulfúrico. A adinamia dos animais era tratada com tónicos, como o vinho quente e plantas medicinais, como a émula-campana (*Inula helenium*). Na fase crónica, a terapêutica era considerado pouco eficaz e focava-se sobretudo no tratamento das lesões cutâneas, para as quais se utilizavam loções ligeiramente adstringentes, como a solução de acetato de cobre e a tintura de aloés. Para as gretas nos joelhos e jarretes recomendavam-se dessecativos, como o vinho, a tintura de quinquina, a mirra, o aloés, o pó de carvão e a genciana, entre outros (Festal, 1859; Roche-Lubin, 1959; Santin, 1859). Roche-Lubin (1859) recomendou vivamente a cauterização transcorrente aplicada em todas as partes lesadas do corpo do animal no caso de hipertrofia e induração da pele, assegurando ter conseguido tratar assim animais com vastas feridas ulcerosas e deformações locais “monstruosas”. Um século mais tarde, Berthelon e Labeyrie (1938) garantiram ter obtido resultados excelentes com a administração intravenosa de formol 10% (30 ml), de três em três dias, durante o período febril, impedindo a evolução da doença. Para o tratamento dos animais na fase inicial de esclerodermia, Herin (1952) recomendou a administração intravenosa de 20-40 ml de soluto de lugol durante 4 dias, com uma semana de intervalo, até um máximo de 5 injeções.

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 & Potgieter (1985) observaram que a administração de oxitetraciclina, no momento da infeção, 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 infeção e que os coelhos eram um modelo adequado para os ensaios terapêuticos. Em trabalhos posteriores, Shkap, Pipano e Ungar-Waron (1987b) 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.* (2007a) 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, Müller, Boykin, Stephens & Hemphill, 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 de as drogas penetrarem nos quistos (revisto por Alvarez-García *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.

1.9 Vacinação

Na África do Sul e em Israel foram desenvolvidas vacinas vivas atenuadas à base de taquizoítos produzidos em culturas de células. A vacina utilizada na África do Sul foi preparada com um isolado de gnu (Bigalke, Schoeman & McCully, 1974) e a de Israel com um 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 & 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 se desconhece o seu ciclo de vida e modo de transmissão.

1.10 Prevenção

Tendo em consideração os elevados prejuízos económicos e a impossibilidade de tratar ou vacinar, a prevenção passa por evitar que a doença entre na exploração. No caso de a infeção já se ter instalado, é fundamental limitar a sua disseminação e tentar eliminá-la a médio ou longo prazo.

Explorações não infetadas

Nas explorações não infetadas, 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, examinar a conjuntiva da esclera para detetar eventuais quistos e proceder ao despiste serológico da infeção (Ferrié, 1984).

Primeiros casos clínicos

Quando os primeiros casos clínicos são diagnosticados, 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 manada. 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).

Medidas a médio e longo prazo

O rastreio da infeção na exploração passa 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. Esta medida não é praticável se a prevalência for elevada. Neste caso, 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 é importante para evitar o risco de transmissão através de insectos (Ferrié, 1984; Jacqieut *et al.*, 2010; Alvarez-García *et al.*, 2013).

Capítulo II - Revisão sistemática dos estudos para identificação de hospedeiros intervenientes no ciclo de vida de *B. besnoiti*

1. Introdução

Uma vez que *B. besnoiti* pertence ao grupo das coccídeas formadoras de quistos, família Sarcocystidae, pressupõe-se a existência de um ciclo heteroxeno. No entanto, dado que o HD deste parasita ainda não foi identificado, sendo os bovídeos domésticos e silváticos os únicos hospedeiros naturais conhecidos (Pols, 1960; Basson *et al.*, 1970), o seu ciclo tem sido apelidado de “misterioso” por muitos autores. À semelhança de outras coccídeas da família Sarcocystidae, como *T. gondii*, *N. caninum* e o género *Sarcocystis*, presume-se que exista um HD carnívoro, doméstico ou silvático, e um ou vários hospedeiros intermediários (HI) herbívoros e/ou omnívoros. Neste tipo de ciclo, o HD carnívoro infeta-se pela ingestão dos quistos presentes nos tecidos dos animais herbívoros/omnívoros (HI) e estes, pela ingestão de oocistos eliminados nas fezes do HD, quando se alimentam do solo. O fato de os bovinos serem animais de grande porte difíceis de predação e os cadáveres serem geralmente recolhidos, não ficando disponíveis para eventuais hospedeiros necrófagos, sugere a existência de um ciclo silvático na natureza, em que os bovinos são hospedeiros acidentais. Por esta razão, no estudo do ciclo de vida de *B. besnoiti*, é importante procurar não só o HD, como também eventuais hospedeiros intermediários.

As metodologias seguidas para identificação das espécies animais intervenientes nos ciclos de vida dos agentes parasitários incluem a infeção experimental e a pesquisa de anticorpos específicos no soro de potenciais hospedeiros.

O gato doméstico e os felídeos silváticos têm sido frequentemente apontados como candidatos prováveis a HD no ciclo de *B. besnoiti*. De facto, os gatos são os únicos HD conhecidos de outras espécies de *Besnoitia*. No entanto, no caso de *B. besnoiti*, os estudos de infeção experimental em gatos e outros felídeos têm sido contraditórios e não foram publicados estudos serológicos em felídeos. Várias espécies herbívoras foram identificadas como suscetíveis à infeção experimental, mas até à data a infeção natural foi apenas reportada nos bovídeos domésticos e selvagens. Os dados obtidos nos estudos de infeção experimental e serológicos encontram-se dispersos na literatura, em artigos, teses de doutoramento, resumos em congressos, artigos de revisão e manuais de parasitologia. Os estudos publicados carecem de uma revisão profunda dos conteúdos, que permita extrair e compilar os dados qualitativos e quantitativos relevantes, relativos ao número e tipo de ensaios realizados, espécies e número de animais testados, vias de infeção experimental, persistência do parasita nos animais

inoculados e métodos de diagnóstico utilizados. A análise crítica do conjunto destes dados permitirá avaliar melhor o trabalho já realizado, identificar os pontos críticos e explorar novas áreas no estudo do ciclo de vida de *B. besnoiti*.

Neste contexto, os objetivos deste capítulo foram:

- 1) fazer uma revisão sistemática e exaustiva da literatura disponível sobre os estudos de infecção experimental e rastreios serológicos realizados até à data para explorar o ciclo de vida de *B. besnoiti*;
- 2) fazer uma análise crítica dos métodos e resultados apresentados nestes trabalhos e identificar os principais pontos críticos no estudo do ciclo de vida de *B. besnoiti*.
- 3) discutir o conhecimento atual sobre o ciclo de vida de *B. besnoiti*

2. Material e métodos

2.1 Revisão sistemática dos estudos para identificação de hospedeiros intervenientes no ciclo de vida de *B. besnoiti*

A revisão dos trabalhos para identificação de outros hospedeiros no ciclo de vida de *B. besnoiti* incidiu sobre os estudos de infecção experimental e estudos serológicos realizados em espécies domésticas e silváticas. Foram considerados todos os estudos realizados desde 1912, data em que foi publicada a primeira descrição da doença, até ao presente. Com este trabalho procuraram-se coligir todos os dados quantitativos e qualitativos disponíveis. Os dados pesquisados foram os seguintes:

Dados quantitativos:

- Número de ensaios de infecção experimental
- Número de espécies/animais por espécie inoculados experimentalmente
- Doses infetantes utilizadas nos ensaios experimentais
- Número de rastreios serológicos realizados
- Número de espécies/animais por espécie analisados serologicamente

Dados qualitativos:

- Espécies animais analisadas
- Vias de infecção experimental estudadas
- Formas infetantes utilizadas para cada espécie
- Espécies natural e experimentalmente suscetíveis a *B. besnoiti*
- Persistência do parasita em cada espécie
- Ensaio serológico utilizado para o rastreio da infecção.

Fontes do dados

As fontes bibliográficas foram acedidas através de motores de busca electrónicos e de forma convencional, por consulta de artigos, revistas científicas, livros de resumos de congresso e manuais de Parasitologia, disponíveis nas bibliotecas da Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa, no Instituto de Higiene e Medicina Tropical e no Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, Pólo de Benfica.

As bases de dados electrónicas consultadas foram: Pubmed; Google; Arquivos históricos da biblioteca nacional de França, acedidos via <http://gallica.bnf.fr>.

A pesquisa dos dados foi efetuada por nome de autor e designação atual e antigas da doença (besnoitose, globidiose, sarcosporidiose cutânea, elefantíase) e do parasita (*B. besnoiti*, *Sarcocystis besnoiti*, *Globidium besnoiti*, *Isospora besnoiti*).

2.2 Análise crítica dos estudos realizados

Os trabalhos relativos ao ciclo de vida de *B. besnoiti* foram analisados comparativamente aos estudos realizados com outras espécies de *Besnoitia* e parasitas filogeneticamente próximos, como *N. caninum* e *T. gondii*.

3. Resultados

3.1 Estudos para identificação do hospedeiro definitivo

Trabalhos publicados

Entre 1960 e 2012 foram publicados 7 estudos de infeção experimental (Pols, 1960; Peteshev *et al.*, 1974, 1975, 1976; Rommel, 1975; Diesing *et al.*, 1988; Basso *et al.*, 2011) e dois estudos serológicos (Berhault, 2008; Millán *et al.*, 2012) destinados a identificar potenciais hospedeiros definitivos de *B. besnoiti*. Estes trabalhos incidiram sobre várias espécies predadoras de mamíferos, aves e répteis (Anexo 1). Os estudos de Peteshev *et al.* (1974, 1975, 1976), publicados em russo, não se encontram disponíveis para consulta. A informação referente às espécies estudadas por Peteshev *et al.* (1974, 1975, 1976) foi retirada de citações de outros autores, nomeadamente Levine e Ivens (1981) e Tadros & Laarman (1982).

Número de espécies e animais testados nos estudos de infeção experimental

Os estudos de infeção experimental incidiram sobre 4 famílias de mamíferos carnívoros (Felidae, Canidae, Viverridae e Herpestidae), 3 famílias de aves carnívoras (Corvidae,

Ciconiidae, Accipitridae) e 2 famílias de répteis (Colubridae, Viperidae). Os 7 trabalhos de infecção experimental abrangeram 26 espécies, num total de 118 animais, não contando com o número desconhecido de cães, lobos, raposas e corvos testados por Petechhev *et al.* (1974). Os animais mais estudados foram o cão (*Canis familiaris*) (n=36) e o gato doméstico (*Felis catus*) (n=25). Os restantes 20 mamíferos incluíram felídeos selvagens (gato da Líbia, serval, gato da selva, lince do deserto, leão, leopardo, chita), o chacal de dorso negro, a raposa do cabo, a geneta e mangustos. Entre as aves testadas encontravam-se marabus, grifos do cabo e corvos. Os répteis estudados incluíram cobras e víboras (Anexo 1).

Estes estudos foram realizados na África do Sul (Pols 1960; Diesing *et al.*, 1988), Casaquistão (Peteshev *et al.*, 1974¹⁶, 1975¹⁷, 1976¹⁸), Uganda (Rommel, 1975), Alemanha (Diesing *et al.*, 1988) e Suíça (Basso *et al.*, 2011). Os trabalhos foram realizados com isolados locais, com exceção do estudo de Diesing *et al.* (1988) e Basso *et al.* (2011) que utilizaram, respetivamente, isolados obtidos em Israel e na Alemanha.

Vias de infecção experimental e formas infetantes utilizadas

Praticamente todos os autores escolheram a via de inoculação oral para os estudos de HD. Pols (1960) foi o único a utilizar a via parentérica, inoculando um cão por via intravenosa com uma suspensão de fígado e baço (10 ml) e com sangue (10 ml) de um coelho na fase aguda. As referências a Peteshev *et al.* (1974)¹⁶ indicam que os autores utilizaram quistos, mas não foi possível apurar se estes foram administrados isoladamente ou juntamente com os tecidos (cutâneo ou outros), não existindo igualmente qualquer informação quanto à quantidade de quistos/tecido administrado ou à idade/sexo dos animais inoculados. Diesing *et al.* (1988) administraram tecido conjuntivo e muscular, contendo numerosos quistos parasitários, por uma ou mais vezes a diferentes espécies carnívoras. Também estes autores não forneceram dados relativamente às quantidades administradas, nem à idade/sexo dos animais inoculados. Rommel (1975), num primeiro ciclo de um total de 6 experiências, administrou 150 g de pele fortemente parasitada, cortada em pequenos fragmentos, a 28 cães com 8 semanas de idade, 14 gatos e um serval jovem. Num segundo ciclo, administrou a totalidade da pele, órgãos e tecido muscular de um bovino infetado a 4 marabus mantidos em jaulas individuais e 11 grifos do cabo. Basso *et al.* (2011) inoculou 2 gatos e 3 cães com $1,5 \times 10^6$ taquizoítos e 3 gatos e 2 cães com fragmentos de pele medindo $0,25 \times 0,25 \text{ cm}^2$, contendo pelo menos 2×10^7 bradizoítos de *B. besnoiti*. A idade dos animais inoculados variou entre 19 e 48 meses nos gatos e 2 e 11 meses nos cães.

Suscetibilidade das espécies carnívoras à infecção

O cão inoculado por via parentérica por Pols (1960) não apresentou manifestações clínicas ao longo de um período de 3 meses. Não foram pesquisados oocistos, nem foram feitos outros testes para despistar a infecção subclínica do cão. Peteshev *et al.* (1974)¹⁶ reportaram a eliminação de oocistos em dois gatos domésticos e num gato bravo (*F. silvestris lybica*), 13-16 dias pós-infecção. Nenhum dos outros animais eliminou oocistos. Os autores descreveram oocistos não esporulados, medindo 14,3-15,7 x 11,4-14,3 µm, sem micrópilo. Os oocistos foram eliminados durante um período de 3-5 dias. O gato bravo morreu no 13º dia pós-infecção enquanto os gatos domésticos se mantiveram clinicamente sãos. Depois de esporulados, os oocistos apresentavam 2 esporocistos, cada um com 4 esporozoítos, assemelhando-se aos oocistos de *T. gondii*.

Rommel (1975) detetou um pequeno número de oocistos medindo 12,9-15,8 x 11,5-15,8 µm, 6-23 dias pós-inoculação nas fezes de 10 cães e alguns oocistos não esporulados, medindo 14,3-15,7 x 11,4-14,3 µm, 4-5 dias pós-infecção, nas fezes de 6 gatos. Diesing *et al.* (1988) referiram a presença de um pequeno número de oocistos nas fezes de um dos 3 leopardos, durante 19-43 dias a seguir à inoculação com bradizoítos de *B. besnoiti*. Estes oocistos mediam 15,5 x 14,0 µm e mostraram ser do tipo *Isospora* depois de esporulados. Ocasionalmente, foram também detetados alguns oocistos do tipo *Isospora* (depois de esporulados) nas fezes de um mangusto listrado. Nenhum dos outros animais inoculados excretou oocistos. No estudo mais recente de Basso *et al.* (2011), nenhum dos animais infetados experimentalmente eliminou oocistos.

Metodologia de diagnóstico dos oocistos e confirmação do agente

Relativamente ao trabalho de Peteshev *et al.* (1974)¹⁶ não dispomos de informação quanto à metodologia utilizada para a detecção dos oocistos nas fezes. Estes autores, depois de incubarem os oocistos colhidos das fezes dos gatos em água durante 6 dias a 6 meses, reportaram a indução de sinais clínicos de besnoitiose em esquilos terrestres, ratinhos, caprinos, ovinos e num vitelo. De seguida infetaram oralmente ratinhos com quistos de *B. besnoiti* de origem bovina e com sangue de caprinos febris, infetados com os oocistos, colhidos dos gatos. Os cérebros destes ratinhos foram por sua vez inoculados por via oral em gatinhos, que 6-7 dias mais tarde excretaram oocistos. Depois de esporulados, estes oocistos mostraram ser infetantes para esquilos terrestres, com desfecho fatal. Não foram efetuados estudos serológicos para determinar a seroconversão dos animais ou estudos histopatológicos para confirmação dos quistos. Rommel (1975) também não forneceu qualquer informação relativamente à metodologia de diagnóstico dos oocistos nas fezes e não confirmou a

identidade dos oocistos encontrados nos cães e gatos, quer por inoculação de outras espécies animais suscetíveis, quer por métodos imunológicos. Diesing *et al.* (1988) colheram diariamente as fezes dos animais inoculados e pesquisaram a presença de oocistos através de técnicas de flutuação com $ZnCl_2/NaCl$, durante um período mínimo de 3 semanas. Os oocistos isolados do leopardo foram administrados oralmente a 2 bovinos, que não evidenciaram quistos de *B. besnoiti* quando abatidos ao fim de 82 e 113 dias, respetivamente. Os oocistos eliminados pelo mangusto foram administrados oralmente a um vitelo, que aparentemente não desenvolveu quistos. Não foram facultados dados relativamente à quantidade de oocistos inoculados, nem foram feitos estudos serológicos, quer nas espécies carnívoras, quer nos bovinos inoculados.

Basso *et al.* (2011) examinaram as fezes dos cães e gatos diariamente para detetar a presença de oocistos, a partir do 2º dia de inoculação, durante 11 semanas. O diagnóstico dos oocistos foi feito através de uma técnica de sedimentação-flutuação utilizando uma solução de sacarose. As fezes dos gatos inoculados com bradizoítos foram analisadas até às 20 semanas pós-infecção. A infecção dos animais foi confirmada pela análise serológica, através da técnica de IFI. Não se verificou seroconversão nos cães inoculados com taquizoítos ou bradizoítos e nos gatos inoculados com taquizoítos. Em 2 dos 3 gatos inoculados com bradizoítos, a presença de anticorpos específicos anti-*B. besnoiti* foi demonstrada 5-7 semanas pós-infecção, com títulos ≥ 100 . Através da técnica de imunoblot, o padrão de reação do soro dos 2 animais contra antigénios de taquizoítos foi idêntico ao observado nos bovinos com infeções naturais.

Número de espécies e animais testados nos estudos serológicos

Millán *et al.* (2012) pesquisaram a presença de anticorpos anti-*B. besnoiti* num total de 205 animais, abrangendo 15 espécies silváticas e gatos domésticos errantes. O estudo envolveu 16 lobos (*Canis lupus*), 41 raposas vermelhas (*Vulpes vulpes*), 21 martas (*Martes martes*), 8 fuínhas (*Martes foina*), 12 texugos (*Meles meles*), 18 genetas (*Genetta genetta*), 5 sacarrabos (*Herpestes ichneumon*), 28 gatos bravos (*Felis silvestris*), 43 gatos domésticos errantes (*Felis catus*), 3 lince ibéricos (*Lynx pardinus*), 1 doninha (*Mustela nivalis*), 2 toirões (*Mustela putorius*), 4 lontras (*Lutra lutra*), 1 visão americano (*Neovison vison*), 1 quati de cauda anelada (*Nasua nasua*) e 1 guaxinim (*Procyon lotor*). As amostras de soro foram analisadas por IFI e por Western blot (utilizando antigénio de bradizoítos ou taquizoítos). Doze dos animais testados (8 dos quais gatos) mostraram resultados positivos na IFI mas não se confirmaram por Western blot. Quanto à origem geográfica dos animais testados por Millán *et al.* (2012), 88 foram capturados em zonas com casos de besnoitiose bovina em Espanha, nomeadamente nas regiões da Cantabria, Castilla-La-Mancha, Castilla y León e

Valencia, sendo os restantes 112 soros provenientes de regiões sem registo de casos de besnoitiose bovina (Andaluzia, ilhas Baleares e Astúrias). Os 88 soros foram obtidos de 30 raposas vermelhas, 5 martas, 5 texugos, 2 lontras, 1 visão, 1 guaxinim, 7 genetas, 5 sacarrabos, 3 linceos ibéricos, 25 gatos bravos e 4 gatos vadios. Os resultados não forneceram qualquer evidência de que dentro da área geográfica estudada em Espanha os carnívoros silváticos possam estar implicados na transmissão de *B. besnoiti*. Berhault (2008) testou apenas 2 raposas vermelhas e 2 texugos capturados em França na região de Maine e Loire, próximo de uma exploração com casos de besnoitiose bovina, sem resultados positivos.

3.2 Estudos para identificação de hospedeiros intermediários

Relativamente aos estudos de hospedeiros intermediários de *B. besnoiti*, entre os anos 1912 e 2011 identificámos 17 publicações, 16 de infeção experimental e apenas um estudo serológico. Os trabalhos de infeção experimental contemplaram a transmissão parentérica, oral, mecânica através de vetores artrópodes e por via iatrogénica. Não nos foi possível obter o texto integral de todos os estudos efetuados, pelo que nalguns casos, os dados indicados foram extraídos de citações de outros autores.

Os estudos referidos incidiram na maior parte sobre espécies herbívoras, em especial bovídeos e pequenos ruminantes. Os ensaios realizados incluíram também roedores das famílias Muridae, Caviidae, Cricetidae, Petromuridae, Sciuridae e Erinaceidae, um cavalo e aves (pardal montês e galinhas). No total foram testadas 27 espécies (Anexo 2). Os resultados da infeção experimental nas diferentes espécies variaram em função da via de inoculação e da forma parasitária utilizada. Segundo Levin & Ivens (1981), Peteshev *et al.* (1974)¹⁶ terão inoculado marmotas com material de origem bovina, com desfecho fatal 10-12 dias pós-inoculação. Peteshev *et al.* (1975)¹⁷ infetaram esquilos (*Spermophilus fulvo*) com sangue de bovinos severamente afetados e com merozoítos obtidos dos quistos, por via parentérica. Após um período de incubação de 3 dias, a infeção disseminou-se a todos os órgãos e os animais morreram ao fim de 8-14 dias. Mais tarde Peteshev e Polomoshnov (1976)¹⁸ estabeleceram que *Odantra zibethica*, *Microtus arvalis*, *Rhombomys opimus*, *Lepus tolai* e *Passer montanus* eram reservatórios de *B. besnoiti* no Casaquistão (Anexo 2). Nesta citação, não foi fornecida qualquer indicação quanto à via de inoculação, à forma parasitária ou aos métodos de confirmação utilizados.

Infeção oral com quistos

A infeção oral de potenciais HI com formas quísticas de *B. besnoiti* foi experimentada por Besnoit e Robin (1912) e Franco e Borges (1915, 1916) no coelho, rato e ratinho e mais tarde, por Bigalke (1968), em bovinos. Nenhum dos animais inoculados manifestou sinais de besnoitose bovina. Os primeiros autores não verificaram a hipótese de infeção subclínica dos animais inoculados, mas Bigalke (1968) demonstrou a ausência de infeção através da inoculação experimental, da ausência de quistos e da imunidade à reinfeção. Peteshev *et al.* (1974¹⁶, 1975¹⁷) terão conseguido induzir a infeção em ovinos, caprinos, ratinhos e esquilos terrestres através da administração de quistos. Não foram encontrados mais registos de tentativas de infeção oral de potenciais HI com bradizoítos (Anexo 2).

Infeção parentérica com bradizoítos

A infeção parentérica com bradizoítos, foi explorada em bovinos por inoculação intramuscular, subcutânea, intraperitoneal e implante de enxertos de pele por Besnoit e Robin (1912) e por via im, sc e enxertos de pele por Pols (1960). Nenhum dos animais evidenciou sinais clínicos, mas os autores não verificaram a hipótese de se ter estabelecido uma infeção subclínica nos animais. Mais tarde Bigalke (1968), comprovou que os bradizoítos eram transmissíveis a coelhos e bovinos por inoculação parentérica e Neuman (1962) confirmou estes achados em coelhos e gerbilos. Bigalke (1968) iniciou uma série de ensaios para demonstrar a possibilidade de transmissão mecânica através de artrópodes (tabanídeos, glossinas e moscas do estábulo) e por via iatrogénica. Nos coelhos, a infeção através dos vetores artrópodes e por via iatrogénica induziu os sinais típicos de besnoitose. Os bovinos, pelo contrário, desenvolveram apenas sinais agudos inespecíficos, nunca apresentando os sinais característicos de anasarca e esclerodermia. Basson *et al.* (1970) também observaram manifestações acentuadas em coelhos inoculados por via subcutânea com homogeneizados de pele de bovino. Contrastando com estes resultados, Cortes *et al.* (2006a) verificaram que a inoculação intraperitoneal de 10^7 bradizoítos a 2 coelhos não provocou doença, embora os animais seroconvertessem. Franco e Borges (1915, 1916) inocularam ratos com suspensões de pele, mas não observaram sinais clínicos compatíveis com besnoitose. Num estudo mais recente, Basso *et al.* (2011) infetaram ratinhos, gerbilos e cobaios por inoculação subcutânea de bradizoítos. Nenhum dos animais manifestou sinais de doença, mas a infeção subclínica foi demonstrada por serologia, histopatologia e PCR (Anexo 2).

Infeção oral com formas proliferativas

A infeção oral do HI com taquizóitos foi experimentada por Pols (1960) em coelhos e por Bigalke (1968) em bovinos. Pols (1960) utilizou suspensões preparadas a partir de fígado e baço e fezes de coelho na fase aguda da infeção. Os coelhos inoculados não exibiram manifestações clínicas de besnoitiose e não ficaram imunes à reinfeção com formas proliferativas, pelo que se concluiu que provavelmente não se infetaram. Bigalke (1968) conseguiu induzir a infeção em bovinos através da inoculação oral de uma suspensão de vísceras de coelho com manifestações agudas de besnoitiose. A infeção dos bovinos foi confirmada através da inoculação em coelhos e pela observação de quistos (Anexo 2).

Infeção parentérica com formas proliferativas

A inoculação parentérica foi a via mais utilizada nos ensaios de infeção experimental. Os taquizóitos mostraram ser infetantes para os bovinos por via parentérica, provocando a infeção clínica em todos os ensaios (Cuillé *et al.*, 1936; Pols, 1960; Basson *et al.*, 1970; Neuman e Nobel, 1981). Todos os ovinos e caprinos inoculados com taquizóitos desenvolveram sinais clínicos de besnoitiose. Com exceção dos coelhos inoculados por Cortes *et al.* (2006a), que permaneceram clinicamente sãos, embora seroconvertessem e apresentassem quistos, todos os autores observaram sinais clínicos nos animais inoculados por qualquer uma das vias parentéricas. O gerbilo aparenta ser a espécie mais sensível entre os murídeos, desenvolvendo manifestações clínicas na maioria dos ensaios (Neuman & Nobel, 1981; Shkap *et al.*, 1987a; Shkap & Pipano, 1993), com exceção do estudo de Basso *et al.* (2011), em que os animais permaneceram clinicamente sãos, embora fossem positivos à serologia, imuno-histoquímica e PCR. No rato, nenhuma das tentativas de infeção experimental levadas a cabo por Besnoit e Robin (1912), Franco e Borges (1915, 1916), Pols (1960) e Shkap *et al.* (1987a) deu origem a manifestações clínicas, mas Shkap *et al.* (1987a) reportaram a seroconversão. Na espécie *Psammomys obesus*, a inoculação intraperitoneal de taquizóitos de cultura foi fatal. A suscetibilidade dos hamsters foi demonstrada por Bigalke (1968), através da inoculação experimental e da detecção do parasita em esfregaço de sangue e por Neuman e Nobel (1981), pela observação dos sinais clínicos. A infeção subclínica foi demonstrada em roedores das espécies *Microtus guentheri* (Shkap *et al.*, 1987a) e *Microtus arvalis*, sendo esta a única espécie onde se comprovou a infeção persistente (Basso *et al.*, 2011). Pols (1960) não observou manifestações clínicas em 16 aves (frangos, galinhas e galos) inoculadas com sangue de coelho contendo taquizóitos. Para além dos esfregaços sanguíneos, com resultados negativos, não foram realizados outros ensaios para despiste da infeção nas aves, nomeadamente provas serológicas ou a pesquisa de quistos (Anexo 2).

Estudos serológicos

O único estudo serológico para despiste de possíveis hospedeiros intermediários de *B. besnoiti* incidiu sobre um total de 1048 soros colhidos de ruminantes silváticos em diversas regiões do norte, centro e sul de Espanha (Gutiérrez-Expósito, 2013).

As espécies amostradas incluíram o veado (*Cervus elaphus*, n = 734), o corço (*Capreolus capreolus*, n = 124), a camurça-dos-Pireneus (*Rupicapra pyrenaica*, n = 170) e o muflão europeu (*Ovis musimon*, n = 20). Destes, 556 (306 veados, 90 corços, 140 camurças dos Pirineus e 20 muflões europeus) eram provenientes de regiões endémicas ou com casos clínicos recentes de besnoitose bovina. O rastreio serológico foi efetuado por uma técnica de ELISA desenvolvida pelos autores, com 61 e 17 reações positivas nos veados e corços, respetivamente, e 15 resultados duvidosos nas camurças dos Pirineus. A positividade foi confirmada por Western blot num veado e num corço.

3.3 Análise crítica dos estudos relativos ao ciclo de vida de *B. besnoiti*

Os trabalhos analisados referentes ao ciclo de *B. besnoiti* foram comparados com os estudos relativos às espécies de *Besnoitia* cujo HD é conhecido e com estudos relativos a *N. caninum* e *T. gondii*. Nos estudos relativos a *B. besnoiti* foram detetadas várias falhas relacionadas, sobretudo, com a representatividade da amostra, o controlo dos ensaios, o inóculo, a origem geográfica dos animais rastreados e os métodos de diagnóstico utilizados. A análise dos artigos permitiu identificar diversos pontos críticos no desenho dos estudos experimentais e dos rastreios serológicos para identificação de potenciais HD e HI. Na Tabela 3 propõe-se uma lista dos pontos críticos a considerar na interpretação dos resultados relatados e no desenho de novos estudos a propósito do ciclo de vida de *B. besnoiti*.

Tabela 3. Pontos críticos nos estudos para identificação de potenciais hospedeiros de *B. besnoiti*.

Estudos	Pontos críticos
Infeção experimental	Seleção da espécie alvo Representatividade do número de animais testados Idade dos animais inoculados Utilização de animais SPF Alimentação controlada dos animais Utilização de animais controlo Condições de alojamento dos animais Via de inoculação Forma parasitária utilizada Preparação do inóculo (pele, quistos isolados, bradizoítos) Dose infetante Sensibilidade e especificidade dos métodos de diagnóstico dos oocistos nas fezes e confirmação da infeção nos potenciais hospedeiros Período pré-patente
Rastreio serológico	Origem geográfica dos animais nos estudos serológicos Especificidade e sensibilidade da técnica serológica Representatividade do número de animais testados

4. Discussão

Uma vez que, até hoje, os bovinos continuam a ser os únicos hospedeiros naturais conhecidos de *B. besnoiti*, o objetivo deste trabalho foi reunir, de forma sistemática, o máximo de informação disponível sobre os estudos relativos ao ciclo de vida e hospedeiros do parasita. A compilação e análise crítica dos dados disponíveis na literatura permitiu avaliar a adequação dos trabalhos realizados, identificar uma série de pontos críticos no estudo dos potenciais hospedeiros e propor novas abordagens para deslindar o ciclo de vida de *B. besnoiti*.

Embora o leque de candidatos a hospedeiros definitivos e intermediários testados até hoje seja relativamente vasto, com 24 espécies carnívoras e 27 espécies não carnívoras analisadas, foram encontradas várias lacunas nos trabalhos publicados, que comprometem a interpretação e a validade dos resultados. O número de estudos de infeção experimental realizados para identificar o HD é surpreendentemente baixo, com apenas 5 trabalhos publicados, num período de 100 anos. Peteshev *et al.* (1974)¹⁶ afirmaram ter deslindado o ciclo de *B. besnoiti*, ao identificar os felídeos como HD. De facto, nas citações do trabalho de Peteshev *et al.* (1974)¹⁶, foram fornecidos dados relativamente ao período pré-patente, tempo de eliminação e dimensões dos oocistos, bem como ao cumprimento dos postulados de Koch,

através da indução de sinais clínicos de besnoitiose em esquilos terrestres, ratinhos, caprinos, ovinos e num vitelo. Todavia, a falta de controlo destes estudos e o facto de outros autores, mais tarde, não terem conseguido reproduzir o ciclo, desacreditaram o trabalho de Peteshev *et al.* (1974)¹⁶. Curiosamente, também Rommel (1975)¹⁷ e Diesing *et al.* (1988) reportaram a eliminação de oocistos do tipo *Isospora*, de tamanho semelhante ao descrito por Peteshev *et al.* (1974)¹⁶, respetivamente, em 6 de 14 gatos e um de 3 leopardos inoculados. Infelizmente, à data dos primeiros estudos, não existiam ainda as técnicas de diagnóstico molecular que hoje são um instrumento fundamental na determinação da espécie dos oocistos e não foram conduzidos mais ensaios para identificação da espécie.

Outras lacunas foram a utilização de animais cujo estado parasitário previamente à infeção experimental era aparentemente desconhecido, a falta de informação sobre as condições de alojamento e dieta dos animais e a não utilização de animais controlo, condições essenciais para excluir a infeção com outras espécies de coccídeas. Rommel (1975), admitindo não ter realizado estudos serológicos ou outros para confirmar a infeção e a identidade dos oocistos encontrados nos gatos, não excluiu tratarem-se de estádios do ciclo de vida de *B. besnoiti*. Já Diesing *et al.* (1988) afastaram esta hipótese, depois de administrar os oocistos a 2 bovinos, que não desenvolveram sinais clínicos e nos quais não detetaram quistos após o abate, cerca de 3-4 meses pós-inoculação. No entanto, à semelhança dos seus antecessores, Diesing *et al.* (1988) também não confirmaram a ausência de infeção no leopardo, nem nos bovinos inoculados com oocistos por meio de métodos serológicos, ou outros, sabendo-se hoje, que a maioria das infeções por *B. besnoiti* é subclínica e que a deteção dos quistos cutâneos é falível. Facto é que Basso *et al.* (2011), embora não tenham conseguido identificar oocistos nas fezes dos animais inoculados, demonstraram pela primeira vez a seroconversão em 2 de 3 gatos alimentados com fragmentos de pele contendo quistos de *B. benoiti*, confirmada por títulos IFI ≥ 100 e um padrão de reação no imunoblot semelhante ao observado em bovinos infetados.

Hoje sabe-se que, ao contrário de *T. gondii*, os gatos domésticos infetados com *B. neotomofelis* (Dubey & Yabsley, 2010), *B. darlingi* (Dubey *et al.*, 2002) e *B. oryctofelisi* (Dubey *et al.*, 2003) eliminam um baixo número de oocistos, mesmo quando são administradas grandes quantidades de tecido infetado. No caso de *B. wallacei* e *B. darlingi*, nem todos os gatos inoculados desenvolveram infeções patentes. Estes dados poderão significar uma baixa eficiência na transmissão destas espécies de *Besnoitia* através de oocistos, ou que existem outros hospedeiros definitivos mais adaptados. A possibilidade dos oocistos de *B. besnoiti* serem eliminados em quantidades diminutas, à semelhança das outras espécies de *Besnoitia*, exige uma pesquisa intensiva dos oocistos nas fezes, de preferência com recurso

a mais de uma técnica coprológica, de forma a maximizar a sensibilidade do diagnóstico.

Dada a variabilidade na eliminação de oocistos, é também importante que os estudos de infecção experimental sejam conduzidos com um número adequado de animais de cada espécie. No entanto, nos estudos realizados para identificação do HD, verificou-se uma grande desproporção no número de animais testados por espécie, sendo que cerca de metade destes foram cães (n=36) e gatos (n=25). Com exceção dos grifos do cabo (n=11), das cobras da espécie *Coluber ravergeri* (n=8) e dos marabús (n=4), foram apenas testados 1-3 animais por espécie, o que poderá ser insuficiente para excluir qualquer uma das outras 21 espécies analisadas como hospedeiro de *B. besnoiti*.

Outro fator a ter em consideração é a idade dos animais, uma vez que a produção de oocistos pode variar entre os diferentes grupos etários. No caso de *T. gondii*, por exemplo, a utilização de animais com mais de 12 meses nos estudos de infecção experimental é desaconselhada, uma vez que tanto o número, como o período de eliminação de oocistos nos gatos adultos é menor que nos jovens (Lindsay & Dubey, 2013). O estudo de Basso *et al.* (2011) é o único em que a idade dos animais é referida, tendo os gatos idades compreendidas entre os 19-39 meses e os cães entre 2-11 meses.

Quanto à forma parasitária utilizada, embora a maioria dos autores tenha utilizado bradizoítos para infecção dos potenciais HD, no estudo de Basso *et al.* (2011), 2 dos 5 gatos e 3 dos 5 cães foram inoculados com taquizoítos. Dos trabalhos com *T. gondii* sabe-se que a excreção de oocistos pelos gatos é apenas fiável com a inoculação de bradizoítos. Estes são biologicamente resistentes à digestão no estômago e permanecem infetantes por via oral, ao passo que os taquizoítos são facilmente destruídos pelo suco gástrico. A resistência dos bradizoítos de *T. gondii* à digestão pelo suco gástrico é conhecida há muitos anos. Jacobs, Remington & Melton (1960) verificaram que os bradizoítos de *T. gondii* conseguem sobreviver numa solução de HCl-pepsina por um período de 2 h ou mais, enquanto que os taquizoítos são destruídos ao fim de uma hora. No estudo de Basso *et al.* (2011), apenas os gatos inoculados com bradizoítos seroconverteram, sendo provável, que também aqui os taquizoítos de *B. besnoiti* tenham sido destruídos no estômago dos animais.

Outro fator a ter em conta é o período pré-patente, desde a infecção à eliminação das formas parasitárias nas fezes. Embora este período seja geralmente inferior a duas semanas, como no caso de *B. darlingi* (9-11 dias) (Dubey *et al.*, 2002), *B. oryctofelisi* (9-13 dias) (Dubey *et al.*, 2003) e outros apicomplexa filogeneticamente próximos, incluindo *Toxoplasma gondii* (3-10 dias) (Dubey, 2009), noutros, o tempo até à excreção dos oocistos pode ser mais longo, como *Neospora caninum* (5-27 dias) (Dubey, Schares & Ortega-Mora, 2007) e *B. neotomofelis* (11-30 dias) (Dubey & Yabsley, 2010). Deste modo, nos estudos de infecção

experimental, é necessário garantir que a pesquisa dos oocistos seja conduzida numa base diária e durante um tempo suficientemente longo para comportar períodos pré-patentes mais extensos. Peteshev *et al.* (1974)¹⁶ e Rommel (1975), embora tenham indicado o período pré-patente dos animais que eliminaram oocistos, não forneceram informações completas sobre o tempo ou a periodicidade da pesquisa de oocistos nas fezes dos outros animais inoculados, sabendo-se apenas que Rommel (1975) analisou as fezes das aves carnívoras durante 4 semanas pré e 8 semanas pós-inoculação. Diesing (1988) observou diariamente as fezes dos animais inoculados, durante um período mínimo de 3 semanas, verificando a eliminação de oocistos por um leopardo, 19-43 dias depois de ter ingerido os tecidos infetados, mas não especifica os tempos para cada uma das outras espécies estudadas. Já Basso *et al.* (2011) procederam à pesquisa diária dos oocistos na totalidade das fezes durante 11 semanas, no caso dos cães e durante 20 semanas, no caso dos gatos infetados com bradizoítos, não sendo provável que os animais inoculados tenham excretado oocistos depois deste período.

A descrição do inóculo, quanto à sua preparação e dose utilizada, é fundamental para comparar os trabalhos e estabelecer a dose mínima infetante. Infelizmente, apenas Basso *et al.* (2011) indicaram o número de bradizoítos utilizados. Quanto à preparação do inóculo, Basso *et al.* (2011) utilizaram fragmentos de pele, Diesing *et al.* (1988) pele e músculo, Rommel (1974) pele (cães e gatos) e a totalidade da carcaça (aves carnívoras) e Peteshev *et al.* (1974)¹⁶ terá administrado quistos, desconhecendo-se sob que forma. Dado o encapsulamento dos quistos de *B. besnoiti* no tecido conjuntivo da derme, é questionável se a digestão da pele no estômago consegue libertar os bradizoítos em quantidade suficiente para infetar os animais e dar origem à excreção de oocistos. A administração de quistos isolados ou de tecido muscular contendo quistos não encapsulados poderá fazer mais sentido, até porque, na natureza, os felídeos e outros carnívoros geralmente não se alimentam da pele dos animais caçados, sobretudo quando se trata de animais de grande porte.

Relativamente aos hospedeiros intermediários, para além dos bovinos, os trabalhos de infecção experimental demonstraram que os ovinos, caprinos, leporídeos, ratinhos, gerbilos, cobaios, hamsters e outros membros das famílias Cricetidae (*Odantra zibethicus*, *Microtus arvalis*), Sciuridae (esquilo terrestre) e Erinaceidae (marmota) são suscetíveis à infecção. Destes, os mais sensíveis aparentam ser os ovinos, caprinos, leporídeos e gerbilos, conforme demonstrado pela consistência e gravidade das alterações clínicas registadas em quase todos os ensaios, enquanto nas outras espécies a infecção nem sempre dá origem a manifestações clínicas e estas, quando presentes, são geralmente mais ligeiras. Os primeiros autores (Besnoit & Robin, 1912; Franco & Borges, 1915, 1916) basearam-se exclusivamente na observação clínica para confirmar a infecção nos ensaios experimentais, verificando a ausência de

manifestações clínicas na totalidade dos animais inoculados. A suscetibilidade de outros hospedeiros a *B. besnoiti* viria a ser demonstrada mais tarde, não só pela indução de sinais clínicos nalgumas espécies, como também pela confirmação laboratorial da infeção em diversas espécies que não apresentavam sinais clínicos após a inoculação.

A evolução no diagnóstico laboratorial da infeção, com a introdução da serologia na década de 1970 e das técnicas de PCR a partir de 2006, veio claramente demonstrar a capacidade de *B. besnoiti* invadir os tecidos de vários hospedeiros mamíferos, à semelhança dos seus congéneres *T. gondii* e *N. caninum*. Tal como nestes parasitas, a suscetibilidade a *B. besnoiti* difere muito entre as espécies inoculadas, variando desde infeções subclínicas, a doença grave e fatal.

Quanto às aves, existe apenas um relato referente a Peteshev *et al.* (1976)¹⁸, que testemunha a infeção fatal de *Passer montanus* com material de origem bovina. Embora as aves (frangos, galinhas, galos) inoculadas por Pols (1960) e os répteis e grifos infetados por Diesing *et al.* (1988) não apresentassem sinais clínicos, não foram efetuados exames laboratoriais que pudessem excluir a infeção destas espécies.

No que concerne os estudos serológicos para rastreio de potenciais hospedeiros intermediários/definitivos, os pontos críticos identificados prendem-se com a representatividade da amostra, o desempenho do teste e a origem geográfica dos animais. Ao todo identificámos apenas 3 estudos serológicos, 2 em animais carnívoros e um em ruminantes silváticos, realizados entre 2008 e 2012. Nos estudos relativos ao HD foram testados no total 209 animais, abrangendo 15 espécies silváticas e o gato doméstico. O estudo nos ruminantes silváticos envolveu um total de 1048 animais, distribuídos por 4 espécies. Em qualquer um destes estudos, para um grau de confiança e erro aceitáveis, o número de animais de cada espécie não é representativo, considerando a prevalência desconhecida de *B. besnoiti* nestas espécies e o tamanho desconhecido da população. Acresce ainda o facto de menos de metade dos animais testados, tanto no que diz respeito aos animais carnívoros (n=92), como no caso dos ruminantes silváticos (n=556), ser efetivamente proveniente de uma zona endémica ou com casos de besnoitiose bovina.

Quanto à hipótese de envolvimento de espécies não-mamíferas no ciclo de vida de *B. besnoiti*, Frank e Frenkel (1981) descreveram a presença de quistos de *Besnoitia* no coração de um lagarto (*Lacerta dugesii*) na Madeira, Matuschka & Häfner (1984) demonstraram que várias espécies de víboras (*B. arietans*, *B. caudalis*, *B. gabonica*, *B. nasicornis*), cuja distribuição geográfica cobre quase a totalidade do continente africano, são hospedeiros definitivos de uma espécie desconhecida de *Besnoitia* e *Besnoitia darlingi* foi descrita em lagartos das espécies *Basiliscus basliscus*, *Basiliscus vittatus*, *Ameiva ameiva praesignis* na

América do Sul (Schneider, 1967, 2007). Por outro lado, as aves funcionam como HI de diversas coccídeas, incluindo *T. gondii*, *N. caninum*, sendo que algumas aves predadoras foram também identificadas como hospedeiros definitivos de espécies de *Sarcocystis*, como *Sarcocystis ovalis* e *Sarcocystis accipitris* (Černá & Kvašňovská, 1986; Gjerde & Dahlgren, 2010). No entanto, apesar destes estudos sugerirem a possibilidade de adaptação de *B. besnoiti* a aves ou répteis, o rastreio serológico destas espécies nunca foi realizado.

Relativamente às técnicas de diagnóstico serológico utilizadas, os estudos nos animais carnívoros foram efetuados pela técnica de IFI, utilizando conjugado anti-gato para os felídeos, genetas e sacarrabos e anti-cão para os canídeos e restantes espécies. Estes trabalhos foram realizados sem controlos positivos e com a desvantagem do recurso a anticorpos secundários produzidos para espécies-alvo diferentes, desconhecendo-se o impacto desta circunstância no estudo serológico. O desenvolvimento de técnicas de diagnóstico aptas a serem utilizadas num vasto leque de espécies é, pois, uma prioridade no estudo do ciclo de vida do parasita. Nos ruminantes silváticos, as provas foram previamente validadas e o estudo foi conduzido com controlos, resultando na deteção de anticorpos anti-*Besnoitia* spp. em dois animais provenientes de uma região endémica para *B. besnoiti* em Espanha. No entanto, uma vez que a ocorrência de reações cruzadas com outras espécies de *Besnoitia* ou mesmo com outros apicomplexa não pode ser excluída, serão necessários mais estudos para avaliar o papel das populações de ruminantes silváticos como hospedeiros intermediários de *B. besnoiti*.

Capítulo III - Desenvolvimento e otimização de uma técnica de aglutinação direta modificada para diagnóstico da infecção por *B. besnoiti* (B-MAT)

Os resultados apresentados neste capítulo encontram-se publicados:

Waap, H., Cardoso, R., Marcelino, E., Malta, J., Cortes, H. & Leitão, A. (2011). A modified agglutination test for the diagnosis of *Besnoitia besnoiti* infection. *Veterinary Parasitology*, 178, 217-222.

1. Introdução

O conhecimento da epidemiologia das doenças parasitárias, no que diz respeito à sua prevalência e distribuição geográfica, ciclo de vida, hospedeiros intervenientes e vias de transmissão intra e inter-manadas é crucial para a formulação de estratégias de prevenção e controlo. As técnicas serológicas são instrumentos de diagnóstico essenciais no estudo das doenças infecciosas e, em particular no estudo da besnoitiose bovina, uma vez que a detecção do parasita é problemática quando a densidade dos quistos na pele é baixa. Apesar dos avanços noutras áreas, em especial no domínio do diagnóstico molecular (Cortes *et al.*, 2007b; Schares *et al.*, 2011b), não existem métodos alternativos que consigam substituir o seu espectro de potencialidades. O diagnóstico serológico é considerado o método de eleição no rastreio e monitorização da infecção nas explorações afetadas, nos estudos epidemiológicos relacionados com os surtos da doença, podendo também ser aplicado em estudos transversais para conhecer a prevalência e distribuição geográfica de *B. besnoiti*. Como técnica rápida e pouco invasiva, a serologia encontra igualmente aplicação no diagnóstico dos casos clínicos, em substituição da histopatologia, embora esta permaneça o *gold standard*. Uma vez que o ciclo de vida de *B. besnoiti* é desconhecido, a serologia pode ser utilizada para pesquisar potenciais hospedeiros definitivos ou intermediários.

No presente, as técnicas mais utilizadas no diagnóstico da infecção por *B. besnoiti* são a IFI e a ELISA (García-Lunar *et al.*, 2013), servindo o Western blot de prova confirmatória. A IFI apresenta uma elevada sensibilidade e especificidade (Janitschke *et al.*, 1984; Shkap *et al.*, 2002; García-Lunar *et al.*, 2013), mas torna-se economicamente pesada, exigindo equipamento sofisticado (microscópio de fluorescência), conjugados antiespécie dispendiosos e pessoal especializado. Para além destas desvantagens, a prova é laboriosa, demorada e a leitura depende do operador. Por esta razão, torna-se pouco prática no rastreio da infecção em grandes populações. As provas de ELISA, por outro lado, apesar de permitirem processar

centenas de soros por dia, requerem também conjugados antiespécie e equipamentos dispendiosos e têm apresentado alguns problemas de especificidade, tanto no diagnóstico serológico de *B. besnoiti*, como de outros apicomplexa (Björkman & Lundén, 1998; Gazzonis *et al.*, 2014). Com a expansão da besnoitose bovina, surgiu a necessidade de aperfeiçoar e desenvolver novos testes serológico que deverão reunir, idealmente, as características de elevada sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade, baixo custo, fácil execução e aplicação em larga escala.

A técnica de aglutinação direta para diagnóstico serológico de *T. gondii*, desenvolvida por Fulton e Turk (1959)³¹ (citado por Fulton, 1965) e mais tarde modificada por Desmonts e Remington (1980), é ainda hoje amplamente utilizada como prova de rastreio em Medicina Humana. Esta prova permite o rastreio de uma ampla variedade de potenciais hospedeiros, uma vez que dispensa o uso de conjugados anti-espécie. A técnica de aglutinação direta tem encontrado larga aplicação em Medicina Veterinária, em especial nos estudos epidemiológicos. A prova é comercializada pela Biomérieux (Toxo-Screen DA) e foi validada para diagnóstico da infecção por *T. gondii* no ser humano, com uma sensibilidade de 96% e uma especificidade de 99%. A técnica foi também adaptada para a detecção de anticorpos contra parasitas filogeneticamente próximos como *N. caninum* (Romand, Thulliez & Dubey, 1997; Packham *et al.*, 1998) e *Sarcocystis neurona* (Lindsay & Dubey, 2001). Para além do elevado desempenho em termos de sensibilidade e especificidade, a prova reúne outras vantagens, como a fácil execução, o baixo custo e aplicabilidade em estudos de rastreio serológico. Apesar de o soro ser geralmente a matriz preferida, o teste funciona com plasma e sangue e a hemólise não interfere com o teste (Dubey, 2009).

Neste contexto, um dos objetivos deste trabalho foi desenvolver uma prova de aglutinação direta para pesquisa de anticorpos anti-*B. besnoiti* em soros e outros fluidos orgânicos de bovinos e outras espécies animais.

Fundamentos da prova

A prova de aglutinação direta baseia-se na aglutinação de taquizoítos fixados pelo formol na presença de soro diluído contendo IgG específicas. A prova é realizada em placas de microtitulação com fundo em “U”. Ao soro diluído é adicionado 2-mercaptoetanol (2-ME). O 2-ME previne a aglutinação inespecífica ao quebrar as pontes dissulfeto dos anticorpos IgM, despolimerizando-os. Assim, os títulos obtidos são devidos primariamente à presença de anticorpos resistentes ao 2-ME (IgG). A solução antigénio é constituída por uma suspensão de taquizoítos numa solução alcalina (Tampão BABS), à qual se adicionou albumina, fração V.

³¹ Fulton, J.D., Turk, J.L., 1959. Direct agglutination test for *Toxoplasma gondii*. *Lancet* ii, 1068-1069.

A albumina atua como um agente potenciador da aglutinação, ao diminuir o potencial zeta em torno dos taquizoítos. O potencial zeta indica o grau de repulsão entre partículas adjacentes, possuindo cargas elétricas semelhantes, numa suspensão. Para partículas suficientemente pequenas, se o potencial for baixo, a atração entre as partículas excede a repulsão e as partículas tendem a aglutinar. A seguir a um período de incubação variável, a observação de uma opacidade difusa cobrindo a totalidade da base do poço, correspondente à formação dos complexos antigénio-anticorpo, é interpretada como uma reação positiva. A sedimentação dos taquizoítos sob a forma de botão ou anel corresponde a uma reação negativa (Desmonts & Remington, 1980) (Figura 8).

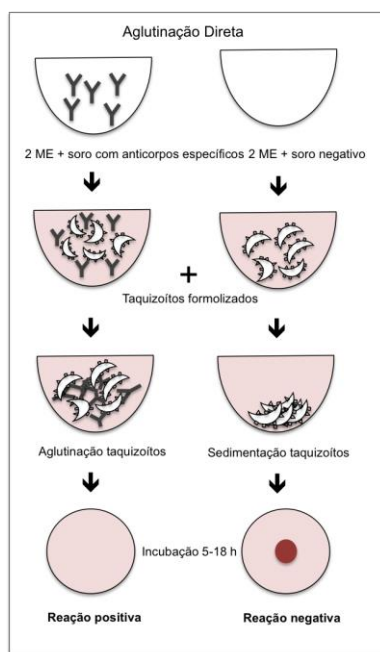


Figura 8. Representação esquemática da reação de aglutinação direta.

2. Material e métodos

2.1 Origem dos soros utilizados no desenvolvimento da técnica

Para efeitos do presente estudo analisámos um total de 614 amostras de soro de bovino. O painel de soros compreendeu os seguintes grupos de amostras:

Soros padrão (n = 139)

Os soros positivos (n = 36) foram colhidos de animais naturalmente infetados com *B. besnoiti*. O estado de infeção foi definido com base em critérios histopatológicos, através da presença de quistos em biópsias de pele e pela demonstração de anticorpos específicos anti- *B.*

besnoiti através da técnica de IFI. Onze destes animais apresentavam sinais clínicos característicos de besnoitiose crónica. Os soros negativos (n=103) foram obtidos de bovinos provenientes de zonas geográficas não-endémicas em Portugal e confirmados por IFI.

Soros de campo provenientes de explorações infetadas (n = 402)

Os soros de campo foram obtidos de animais em explorações com história clínica de besnoitiose bovina em Portugal (n = 171), Espanha (Catalunha) (n = 20) e França (n = 211).

Soros de bovinos serologicamente positivos a *Neospora caninum*

Neste estudo avaliámos a especificidade do B-MAT na presença de anticorpos anti-*N. caninum*, um parasita apicomplexa filogeneticamente próximo de *B. besnoiti* e que também afeta bovinos. Os soros utilizados neste estudo (n = 73) faziam parte da coleção do soros do laboratório de parasitologia do INAV e foram obtidos de explorações com problemas de abortos em Portugal. A seropositividade a *N. caninum* foi determinada por ELISA, utilizando o kit de diagnóstico *N. caninum* Antibody Test Kit, ELISA [IDEXX Laboratories], segundo as indicações do fabricante. O despiste da presença de anticorpos anti-*B. besnoiti* nestes soros foi efetuado por IFI, com resultados negativos.

2.2 Produção de taquizoítos de *B. besnoiti* para as provas de B-MAT e IFI

Isolamento de *B. besnoiti*

O isolado de *B. besnoiti* (isolado Bb1Évora03) utilizado na preparação da suspensão de antigénio para o B-MAT e no revestimento das lâminas para a prova de IFI foi obtido de um bovino naturalmente infetado (Cortes *et al.*, 2006a).

Na sequência da reemergência da besnoitiose bovina nalgumas explorações na região do Alentejo, vários veterinários tinham sido contactados, para obtenção de material para futuros estudos. Foram-nos comunicados dois casos suspeitos, uma fêmea com 4 anos da raça Saller e um macho Charolês de 6 anos. Os animais eram provenientes de duas explorações distintas no distrito de Évora e apresentavam sinais clínicos compatíveis com besnoitiose bovina. Após o abate, colheram-se amostras de tecido subcutâneo e sangue dos animais. As amostras foram refrigeradas a 4 °C e transportadas para o laboratório da Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa. Com ajuda de um bisturi colheram-se fragmentos de tecido com quistos visíveis a olho nu para placas de Petri contendo tampão fosfato salino (PBS), adicionado com 100 U penicilina/ml, 100 mg estreptomicina/ml e 0,25 mg anfotericina B/ml. Os fragmentos foram lavados duas vezes com esta solução. Os endozoítos foram libertados mecanicamente dos

quistos com uma agulha de 18 G. O PBS contendo bradizoítos livres foi colhido para tubos Falcon e centrifugado a 770 g durante 15 min, a 4 °C. Os *pellets* foram ressuspensos em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com 100 UI/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina, 2 mM l-glutamina, 20 mM HEPES e 10% soro fetal bovino (SFB). Os bradizoítos foram contados numa câmara de Neubauer. De seguida, inocularam-se 5×10^6 bradizoítos em monocamadas de células Vero (células epiteliais de rim de macaco verde africano), cultivadas em frascos de cultura T25 com meio DMEM suplementado com 10% SFB. As culturas foram mantidas a 37 °C numa incubadora de CO₂, em atmosfera húmida, com 5% de CO₂. Ao fim de 48 horas, substituiu-se o meio dos frascos inoculados por meio DMEM a 2%, sendo este renovado ao fim de 3 dias. As culturas infetadas foram observadas diariamente ao microscópio invertido com contraste de fase, para detetar a presença de taquizoítos e passadas, aproximadamente de 6 em 6 dias, por tripsinização dos tapetes celulares previamente lavados com PBS pH 7,4.

Manutenção e infeção das culturas celulares

Os parasitas isolados foram propagados por passagem contínua em cultura de células Vero. Para tal, foi necessário manter culturas de células infetadas com taquizoítos e células não-infetadas. O número e dimensão dos frascos de culturas infetadas e não-infetadas utilizados em cada momento foram determinados em função das necessidades de produção de antígeno. As células Vero foram cultivadas em frascos de cultura T25, T75 ou T175 contendo meio DMEM suplementado, conforme descrito acima. As células foram mantidas a 37 °C em atmosfera húmida com 5% de CO₂ e sub-cultivadas a cada 3-4 dias, por tripsinização do tapete celular previamente lavado com PBS pH 7,4.

Os taquizoítos colhidos dos frascos infetados foram contados em câmaras de Neubauer e inoculados em novos frascos de cultura de células Vero, aproximadamente duas horas após a sementeira. A quantidade de taquizoítos inoculada foi proporcional ao tamanho dos frascos de cultura. Os frascos T25 foram inoculados com 5×10^6 taquizoítos, os frascos T75 com 15×10^6 taquizoítos e os frascos T175 com 35×10^6 taquizoítos, de forma a manter um rácio taquizoíto/célula de 4:1.

Purificação dos taquizoítos

Após 4-6 dias, os sobrenadantes das culturas infetadas contendo taquizoítos livres foram colhidos para tubos Falcon de 50 ml e centrifugados a $770 \times g$, durante 15 min, a 4 °C. O sedimento foi ressuspensado em 50 ml de PBS. Para separar os taquizoítos dos detritos celulares, purificou-se a suspensão através de colunas de celulose CF11. A celulose

(aproximadamente 2 g) foi lavada três vezes em PBS, por um processo de sedimentação e decantação. Para preparar as colunas, após a última lavagem, passou-se a celulose em suspensão por seringas de 10 ml, até atingir uma altura de 5 cm³. A suspensão de taquizoítos purificada foi passada pela coluna de celulose e colhida em tubos Falcon de 50 ml (Dempster, 1984).

2.3 Prova B-MAT

Preparação do antigénio

Depois de passar pelas colunas de celulose, os parasitas purificados foram lavados duas vezes em 50 ml de PBS. De seguida, ressuspendemos o sedimento em 2-3 ml de formaldeído 6% em PBS. Os parasitas foram fixados a 4 °C, durante cerca de 16 horas e de seguida lavados três vezes com 20 ml de PBS para remover o formaldeído. A seguir à última lavagem, os taquizoítos foram ressuspendidos num mililitro de tampão alcalino pH 8,7 filtrado (poro 0,2 µm) e contados numa câmara de Neubauer. O tampão alcalino foi preparado com 7,02 g NaCl, 3,09 g H₃BO₃, 24 ml 1N NaOH, 50 mg eosin Y, 1,0 g azida de sódio e dH₂O q.b.p. um litro. A composição do tampão é idêntica à do tampão BABS (*bovine albumine buffered saline*) utilizado por Desmonts e Remington (1980) e Packham *et al.* (1998) exceto que a albumina bovina fração V (4 mg/ml) foi adicionada extemporaneamente à suspensão de antigénio. Depois da contagem, ressuspendemos os parasitas num volume de tampão calculado para uma concentração final de cerca de 35–45×10⁶ taquizoítos/ml.

Método do ensaio

Para determinar a diluição *cut-off* com a melhor sensibilidade e especificidade na detecção de anticorpos específicos anti-*B. besnoiti*, testámos todos os soros nas diluições 1:80, 1:160 e 1:320.

Os ensaios foram efetuadas em placas de microtitulação com fundo em U. Os soros foram primeiro diluídos entre 1:40 a 1:160 e dispensados em gotas de 25 µl nas microplacas. De seguida, adicionámos 25 µl de 2-mercaptoetanol (2-ME) 0,2 mol/l diluído em PBS, de modo a obter a diluição final dos soros (1:80-1:160). Em cada placa incluímos um soro controlo positivo, de um animal com quistos cutâneos, e um controlo negativo, de um animal proveniente de uma área geográfica não-endémica e negativo pela prova de IFI. Um dos poços em cada placa foi reservado para controlo do antigénio, utilizando 25 µl de PBS em substituição do soro diluído. De seguida, adicionámos 50 µl da suspensão de antigénio a cada poço. As placas foram cobertas com uma película autocolante e agitadas para misturar os

reagentes. A leitura foi realizada ao fim de 5-18 horas de incubação à temperatura ambiente, num iluminador oblíquo. A observação de uma opacidade difusa cobrindo a totalidade da base do poço foi interpretada como uma reação positiva e a sedimentação dos taquizoítos sob a forma de botão ou anel foi considerada uma reação negativa.

2.4 Prova de Imunofluorescência Indireta

Preparação das lâminas de IFI

As lâminas de IFI foram sensibilizadas conforme descrito por Shkap *et al.* (2002). Os taquizoítos purificados foram lavados uma vez em PBS, ressuspensos numa solução de 4% de formaldeído em PBS e refrigerados sobre gelo, durante 30 min. Após três lavagens, ressuspendemos o sedimento num mililitro de PBS. Os parasitas foram contados numa câmara de Neubauer e diluídos em PBS para uma concentração final de 2×10^6 taquizoítos/ml. A suspensão de antigénio foi de seguida distribuída em gotas de 6 µl sobre lâminas de microscopia ótica, com ajuda de uma pipeta multicanal. As lâminas foram secas a 37 °C e de seguida fixadas em acetona refrigerada a -20 °C, durante 10 min. As lâminas sensibilizadas foram armazenadas a -30 °C até à sua utilização.

Método de ensaio

Os soros foram diluídos em PBS para obter a diluição *cut-off* de 1:256 (Shkap *et al.*, 2002) e dispensados em gotas de 20 µl nos poços das lâminas de fluorescência. A incubação das lâminas foi feita em câmara húmida a 37 °C, durante 45 min. As lâminas foram lavadas duas vezes com PBS durante 5 min e secas com um secador. De seguida, aplicámos 20 µl de conjugado antiovino marcado com isotiocianato de fluoresceína (Serotec AA123F) diluído a 1:200 em cada poço. As lâminas foram novamente incubadas durante 45 min e lavadas como descrito anteriormente. As lâminas secas foram montadas com glicerol tamponado (50% glicerol e 50% PBS pH 8.5) (Shkap *et al.*, 2002). A leitura dos resultados foi feita por dois observadores independentes, num microscópio de fluorescência, utilizando uma ampliação de 400X. De acordo com Shkap *et al.* (2002), considerámos positivos todos os soros em que a totalidade da membrana externa dos taquizoítos apresentou fluorescência brilhante e negativos os soros com fluorescência apical, parcial ou ausente.

2.5 Análise de dados

A IFI foi escolhida como técnica de referência para avaliar o desempenho da prova de B-MAT com soros de campo (animais com história de besnoitiose clínica em Portugal, Espanha e França). Os cálculos referentes à especificidade, sensibilidade e concordância entre testes foram efetuados com o programa estatístico SPSS *Statistics 17.0 package for Windows*. A sensibilidade e especificidade do B-MAT relativamente à IFI foram aferidas para cada uma das três diluições testadas (1:80; 1:160; 1:320). A concordância entre os resultados do B-MAT em cada uma das três diluições e a IFI foi calculada como a proporção de concordância entre os resultados de ambas as provas, utilizando tabelas de contingência 2x2. A medida estatística para avaliar a concordância observada foi o kappa de Cohen (κ). Esta estatística calcula o nível de concordância entre os resultados concordantes em excesso daquilo que seria esperado por acaso. A concordância entre as provas foi avaliada de acordo com Everitt (1989), com base nos seguintes critérios: 0,00 = concordância pobre, 0,01–0,02 ligeira, 0,21–0,40 = considerável, 0,41–0,60 = moderada, 0,61–0,80 = substancial e 0,81–1,00 = excelente.

3. Resultados

3.1 Isolamento de *B. besnoiti*

Os bradizoítos isolados de ambos os animais permaneceram visíveis nas culturas durante 5 dias pós-inoculação. Ao fim dos 5 dias, deixaram de ser visíveis microscopicamente, mas a sua presença nos frascos de cultura foi confirmada através da amplificação de um fragmento de DNA de 149 pb da região ITS1 do parasita. Os produtos amplificados revelaram 100% de identidade com o fragmento sequenciado por Ellis *et al.* (2000) (número de acesso GenBank™ AF076859). Os primeiros taquizoítos foram detetados 30 a 40 dias pós-inoculação, tanto nos frascos inoculados com bradizoítos do bovino da raça Saller, como no bovino charolês. No início observaram-se pequenos núcleos de multiplicação, ao que se seguiu a destruição gradual do tapete celular, com a libertação de um grande número de taquizoítos para o sobrenadante. Os taquizoítos em fase de multiplicação ativa foram criopreservados em soro com 10% de DMSO. Para além do isolamento do parasita, ambos os animais foram serologicamente positivos por IFI, com títulos >1024. A detecção direta do parasita em cortes histológicos das biópsias de pele confirmou o diagnóstico. Este trabalho correspondeu ao primeiro isolamento de *B. besnoiti* em cultura de tecidos, sem recurso à utilização de animais de laboratório.

3.2 Otimização do teste com soros de referência

Concentração do antigénio

Para determinar a concentração ótima de taquizoítos na suspensão de antigénio testaram-se três concentrações de parasitas: $10-20 \times 10^6$, $35-45 \times 10^6$ e $55-65 \times 10^6$. A menor concentração que permitiu uma clara distinção visual entre soros positivos e negativos foi a de $35-45 \times 10^6$ taquizoítos/ml. Esta concentração foi utilizada nos ensaios subsequentes.

Sensibilidade e especificidade do B-MAT utilizando soros de referência

A sensibilidade e especificidade diagnóstica do B-MAT, em comparação com o verdadeiro estado de infeção dos animais, foram avaliadas com soros de referência positivos, obtidos de animais com quistos cutâneos (incluindo animais doentes e subclínicos) e soros negativos de animais provenientes da região Norte de Portugal, sem história de besnoitiose bovina. Ambos os painéis de soros foram também testados por IFI. O B-MAT mostrou uma concordância perfeita (= 1,00) com o verdadeiro estado de infecção dos animais e com a IFI nas três diluições testadas (1:80, 1:160 e 1:320).

Não foram utilizadas diluições $\leq 1:80$ uma vez que no ensaio para avaliar a ocorrência de reação cruzada com *N. caninum* se verificaram nalguns casos reações inespecíficas na diluição 1:40. Com base nestes resultados, de seguida avaliámos o desempenho do B-MAT comparativamente à IFI, com soros de campo, nas diluições 1:80, 1:160 e 1:320.

3.3 Desempenho do B-MAT com soros de campo

O desempenho do B-MAT em comparação com a IFI foi estimado com 402 soros de campo, provenientes de explorações com casos clínicos de besnoitiose bovina, identificadas em Portugal, Espanha e França (Tabela 4). Nos soros de Portugal (n=171), a aplicação de um *cut-off* de 1:80 e 1:160, resultou em três resultados falso negativos e um falso positivo, refletindo uma sensibilidade relativa de 93,8% (Intervalo de confiança [IC] 95%: 86,9–100%) e uma especificidade relativa de 99,2% (IC 95%: 97,6–100%). Na diluição 1:320 observou-se o mesmo nível de especificidade, mas a sensibilidade diminuiu para 89,6% (IC 95%: 80,9–98,2%), devido à ocorrência de cinco resultados falso negativos. Considerando os soros de França (n=211), a sensibilidade relativa foi 100% nas diluições 1:80 e 1:160 e a especificidade relativa respetivamente 98,7% (IC 95%: 97,0–100%) e 99,4% (IC 95%: 98,1–100%), refletindo dois resultados falso positivos na diluição 1:80 e um falso positivo na diluição 1:160.

Tabela 4. Desempenho do B-MAT em comparação com a IFI, considerando os soros de campo de Portugal, Espanha e França.

Origem dos Soros	IFI (pos./neg.)	B-MAT	
		Diluição	Pos/Neg
Portugal (n = 171)	48/123	1:80	46/125
		1:160	46/125
		1:320	44/127
França (n = 211)	52/159	1:80	54/157
		1:160	53/158
		1:320	51/160
Espanha (n = 20)	8/12	1:80	8/12
		1:160	8/12
		1:320	7/13

O aumento do *cut-off* para 1:320 aumentou a especificidade para 100%, mas a sensibilidade diminuiu (98,1%; 95% CI: 94,3–100%). Na análise dos 20 soros provenientes de Espanha, todos os resultados concordaram com a IFI, com exceção de um resultado falso negativo na diluição 1:320 (Tabela 4). Apesar do número reduzido de soros de Espanha não permitir uma análise mais alargada, as observações feitas estão de acordo com os resultados obtidos com os soros de Portugal e França. Considerando a totalidade de soros testados (n=402), na diluição *cut-off* de 1:80, o B-MAT revelou uma sensibilidade relativa de 97,2% (95% CI: 94,1–100%) e uma especificidade relativa de 99,0% (95% CI: 97,8–100%). A 1:160 o B-MAT evidenciou o mesmo nível de sensibilidade e a especificidade aumentou ligeiramente para 99,3% (95% CI: 98,4–100%). A diluição *cut-off* de 1:320 aumentou a especificidade para 99,7% (95% CI: 99,0–100%) mas diminuiu a sensibilidade para 93,5% (95% CI: 88,9–98,2%). No geral, a concordância entre o teste de referência (IFI) e o B-MAT foi excelente em todas as diluições testadas, com índices $\kappa=0,962$ (95% CI: 0,933–0,991), $\kappa=0,968$ (95% CI: 0,941–0,996) e $\kappa=0,948$ (95% CI: 0,913–0,984) nas diluições 1:80, 1:160 e 1:320, respetivamente (Tabela 5).

Tabela 5. Sensibilidade, especificidade e concordância do B-MAT em comparação com a IFI, considerando a totalidade dos soros testados (n=402).

Diluição	% Sensibilidade (IC 95%)	% Especificidade (IC 95%)	K (IC 95%)
1:80	97,2% (94,1–100%)	99,0% (97,8–100%)	0,962 (0,933–0,991%)
1:160	97,2% (94,1–100%)	99,3% (98,4–100%)	0,968 (0,941–0,996%)
1:320	93,5% (88,9–98,2%)	99,7% (99,0–100%)	0,948 (0,913–0,984%)

Na diluição 1:160 a leitura dos resultados foi fácil, as reações positivas apresentaram-se consistentemente como opacidade difusa cobrindo a totalidade do poço e os resultados negativos como um botão ou anel bem definido (Figura 9).

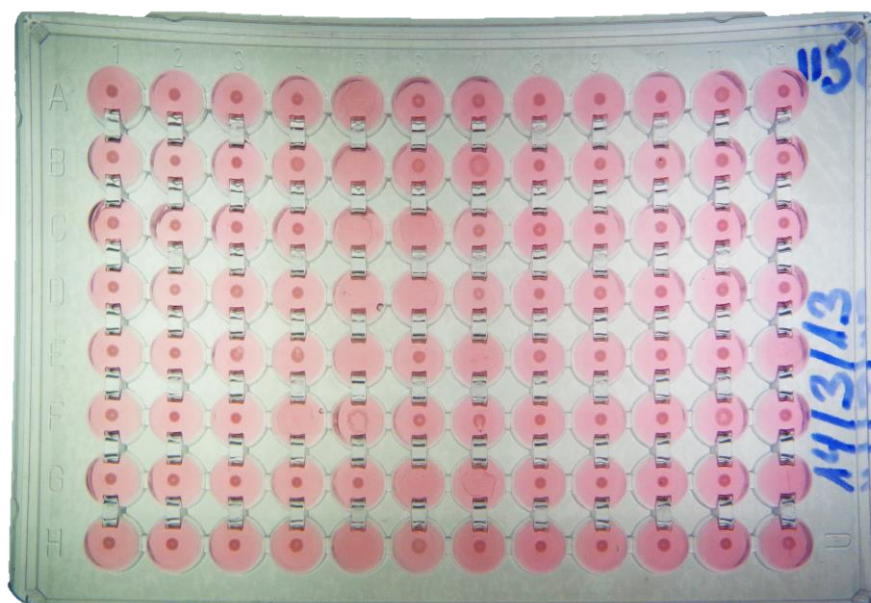


Figura 9. Placa de microtitulação com reações positivas e negativas pela técnica de B-MAT

4. Discussão

Neste estudo desenvolveu-se uma técnica de aglutinação direta modificada para o diagnóstico da infeção por *B. besnoiti*. O protocolo proposto foi adaptado a partir dos testes de aglutinação descritos para os parasitas *T. gondii* (DAT) (Desmonts & Remington, 1980), *N. caninum* (N-MAT) (Packham *et al.*, 1998) e *Sarcocystis neurona* (SAT) (Lindsay & Dubey, 2001). No desenvolvimento deste ensaio optámos por utilizar taquizoítos produzidos em cultura de tecidos, em alternativa ao uso de animais de laboratório. Ao contrário da prova DAT, comercializada pela Biomérieux (Toxo-Screen DA), em que o antigénio é obtido em ratinho, por inoculação intraperitoneal da estirpe *T. gondii* RH Sabin, juntamente com células

de sarcoma TG, as provas N-MAT e SAT descritas para *N. caninum* e *S. neurona* utilizam igualmente taquizoítos produzidos *in vitro*. Considerando a facilidade de propagação dos Toxoplasmatinae em culturas de células, o uso de ratinhos para a produção de antígeno de *T. gondii* é anacrônico e eticamente questionável. Mesmo para o isolamento do parasita, embora a inoculação em ratinhos seja prática corrente, em trabalhos anteriores demonstramos que o sucesso de isolamento de *T. gondii* a partir de tecidos (cérebro e músculo) de animais com infecções subclínicas é comparável aos resultados *in vivo* (Waap *et al.*, 2012).

A concentração de $35\text{--}45 \times 10^6$ taquizoítos/ml permitiu a melhor leitura de resultados, em todos os grupos de soros testados, sem perda de especificidade ou sensibilidade. Esta concentração é semelhante à indicada por Packham *et al.* (1998) para o N-MAT ($30\text{--}40 \times 10^6$ taquizoítos/ml) e por Lindsay e Dubey (2001) para o SAT (50×10^6 taquizoítos/ml), mas é mais elevada que a concentração usada por Desmonts e Remington (1980) no DAT (20×10^6 taquizoítos/ml). Nos ensaios efetuados, as concentrações entre $10\text{--}20 \times 10^6$ deram origem a resultados falso positivos, o que é consistente com as observações feitas por Packham *et al.* (1998) para o N-MAT. Por conveniência, a leitura das placas foi efetuada no dia seguinte ao da prova, embora os resultados pudessem ser lidos ao fim de aproximadamente 5 horas. O período de incubação do B-MAT é assim muito semelhante ao tempo (5–18h) recomendado no protocolo do kit Toxo-screen (Biomérieux). A preservação da forma dos taquizoítos mostrou ser um fator determinante na leitura dos resultados, o que também foi referido por Packham *et al.* (1998) para *N. caninum* e Desmonts e Remington (1980) para *T. gondii*. A leitura dos resultados foi mais fácil quando se utilizaram taquizoítos colhidos de frascos de cultura contendo cerca de um terço do tapete celular. Nesta fase de infecção das células, os parasitas não exibem alterações morfológicas visíveis e encontram-se livres no sobrenadante, dispensando a passagem por agulha e seringa como no caso de *T. gondii* e *N. caninum*. A utilização de taquizoítos que tinham perdido a sua morfologia característica deu origem a resultados falso positivos ou duvidosos (resultados não apresentados). Para evitar a fragmentação dos parasitas, optámos por purificá-los através de colunas de celulose CF 11, em vez dos filtros de 5μ habitualmente utilizados. A utilização de taquizoítos inteiros significa que apenas os antígenos ligados à membrana são responsáveis pela reação com os anticorpos. Isto pode ser vantajoso, considerando que as provas que conservam os antígenos de superfície dos parasitas têm mostrado ser mais específicas no diagnóstico de outros apicomplexa do que as técnicas baseadas em extratos solúveis (Uggla, Hilali & Lövgren, 1987; Björkman & Lundén, 1998). Todos os protocolos de ELISA descritos para *B. besnoiti* usam frações solúveis de parasitas desintegrados como antígeno de revestimento das placas. As proteínas internas poderão ser menos específicas no diagnóstico serológico do que as

proteínas membranares e estar na origem de reações cruzadas, conforme se verificou para *T. gondii*, em que o antígeno obtido por ultrassonicação /congelamento-descongelamento, reagiu com anticorpos contra *Sarcocystis cruzi* e *Sarcocystis tenella* na prova de ELISA (revisado por Uggla & Buxton, 1990). Para além disso, é notória a falta de concordância entre os testes de ELISA baseados em extratos solúveis e a IFI, tanto para *B. besnoiti* (Basso *et al.*, 2013; Gazzonis *et al.*, 2014), como para outros apicomplexa próximos (Lövgren, Uggla & Morein, 1987; Björkman & Hemphill, 1998).

A iscom ELISA, pelo contrário, ao empregar proteínas membranares extraídas com soluções detergentes, mostrou ser mais específica do que as provas convencionais à base de antígeno solúvel, tanto para diagnóstico serológico de infeções por *T. gondii*, como por *N. caninum* (Uggla *et al.*, 1987; Björkman & Lundén, 1998). Por outro lado, para além da importância da membrana externa na especificidade da reação, a própria fixação em formol parece aumentar a sensibilidade do diagnóstico. Assim, verificou-se por exemplo que os títulos serológicos com taquizoítos de *T. gondii* fixos em formol foram significativamente mais elevados em doentes com SIDA com um quadro de encefalite toxoplásmica, comparativamente aos indivíduos sem encefalite toxoplásmica. Estas diferenças não foram observadas com taquizoítos frescos. Os resultados com taquizoítos inteiros formolizados foram também superiores aos obtidos com taquizoítos formolizados ultrassonicados (Suzuki & Remington, 1990). Daqui se concluiu, que tanto a utilização de antígenos membranares como a sua fixação são fatores decisivos para a sensibilidade do diagnóstico. No caso específico de *B. besnoiti*, Schares *et al.* (2013) verificaram, através da biotinylação dos antígenos de superfície e subsequente imunoprecipitação, que alguns dos antígenos com relevância no diagnóstico estão localizados na superfície dos taquizoítos.

Uma vez que a morte dos parasitas produz alterações, tanto na conformação, como na composição antigénica da sua membrana externa, em todo o processo de desenvolvimento da técnica, o tempo de armazenamento dos sobrenadantes contendo os taquizoítos não excedeu 24 horas até à sua utilização. De início, verificou-se que o tampão BABS (*bovine albumin borate saline*), depois de preparado, apresentava sinais de contaminação ao fim de algum tempo no frigorífico, o que dava origem a resultados falso positivos. Para evitar a contaminação do tampão, optou-se por prepará-lo com todos os seus constituintes, à exceção da albumina, uma vez que esta favorece o crescimento de contaminantes. O tampão foi filtrado (poro 0,2 µm) e armazenado a 4 °C, sendo a albumina adicionada extemporaneamente, consoante as necessidades.

Com os soros de referência, o B-MAT mostrou uma concordância perfeita (=1,00) com o verdadeiro estado de infeção dos animais e com a IFI, em todas as diluições utilizadas.

Quando aplicado nos soros de campo de Portugal, Espanha e França, o desempenho do B-MAT foi comparável à IFI, independentemente da origem geográfica das amostras. Considerando a totalidade dos soros de campo, a melhor concordância entre o B-MAT e a IFI foi observada na diluição 1:160, com um índice $\kappa = 0,968$ (95% IC: 0,941–0,996%), uma sensibilidade relativa de 97,2% (95% IC: 94,1–100%) e uma especificidade relativa de 99,3% (95% IC: 98,4–100%). O cut-off 1:160 é mais elevado que as diluições propostas no SAT (1:25), DAT (1:40) e N-MAT (1:80). No entanto, *B. besnoiti* não foi contemplada nos ensaios de reação cruzada efetuados nestes trabalhos (Desmonts & Remington, 1980; Packham *et al.*, 1998; Lindsay & Dubey, 2001). Dos resultados deste estudo concluiu-se que não é possível excluir a reação cruzada com *N. caninum* nas diluições $\leq 1:80$. O B-MAT desenvolvido mostrou ser uma técnica simples, pouco dispendiosa e fiável para o rastreio da besnoitiose bovina em grande escala.

Capítulo IV - Estudo transversal descritivo da infecção por *B. besnoiti* em Portugal continental

Os resultados apresentados neste capítulo encontram-se publicados:

Waap H, Nunes T, Cortes H, Leitão A, Vaz Y (2014). Prevalence and geographic distribution of *Besnoitia besnoiti* infection in cattle herds in Portugal. *Parasitology Research*, 113, 3703-3711.

1. Introdução

O alastramento da besnoitiose bovina na Europa motivou a sua classificação como doença emergente pela autoridade europeia para a segurança alimentar (EFSA) em 2010. No seu parecer, a EFSA reconheceu que diversos aspetos relacionados com a epidemiologia da doença permanecem desconhecidos, incluindo a prevalência e incidência da infecção e dos casos clínicos, as vias de transmissão e os fatores de risco associados. Por essa razão, recomendou que a investigação na área da besnoitiose bovina deverá focar-se no estudo da infecção ao nível das explorações e nas vias de transmissão. Os rastreios serológicos são amplamente utilizados em estudos epidemiológicos, tanto para estimar a prevalência de infeções nas populações, como para determinar a distribuição geográfica das doenças. A interpretação destes rastreios é muitas vezes difícil, porque os resultados são expressos como prevalência aparente, ignorando possíveis vieses relacionados com a imprecisão dos testes e o erro amostral. O ajustamento da prevalência aparente à prevalência verdadeira é essencial para que os resultados de diferentes populações sejam comparáveis. Na ausência de provas serológicas validadas que permitam incluir valores de especificidade e sensibilidade precisos no cálculo da prevalência verdadeira, os métodos bayesianos que têm vindo a crescer em popularidade na análise de dados de rastreios, poderão ajustar-se melhor à incerteza associada à precisão dos testes (Dunson, 2001). Ao combinar a informação *a priori*, obtida junto de peritos ou proveniente de estudos prévios, com os dados obtidos no rastreio, os modelos bayesianos permitem obter inferências sobre a verdadeira prevalência da infecção e o desempenho dos testes. O diagnóstico da infecção por *B. besnoiti* é possível através de uma série de provas serológicas, incluindo a imunofluorescência indireta (Shkap *et al.*, 2002), a ELISA (Shkap *et al.*, 1984, Fernández-García *et al.*, 2010; Schares *et al.*, 2011a, 2013), o imunoblot (Scharés *et al.*, 2010), uma combinação de ELISA e Western blot (Cortes *et al.*, 2006b) e o B-MAT (Waap *et al.*, 2011). Enquanto as primeiras técnicas mostraram recentemente um desempenho elevado num ensaio inter-laboratorial (García-Lunar *et al.*,

2013), a elevada sensibilidade e baixo custo do B-MAT tornam esta prova particularmente adequada ao rastreio em larga escala. No caso de doenças em que se prevê uma prevalência baixa, o uso de uma estratégia de testes em série aumenta o valor preditivo dos testes (Smith, 2006). Espera-se assim, que a utilização do B-MAT como prova de rastreio, seguido da IFI, presumivelmente mais específica, uma vez que é considerada uma prova de referência para confirmação dos positivos (Schares *et al.*, 2013), melhore a eficiência do rastreio.

Os dados de seroprevalência podem ser mapeados e a observação da distribuição espacial das explorações positivas e negativas poderá fornecer uma primeira evidência relativamente à presença de aglomerados (*clusters*) da doença. Aqui, a questão fulcral é testar se os dados geográficos estão distribuídos aleatoriamente, ou se existem regiões com um maior número de explorações positivas que o esperado. Torna-se necessário aplicar testes estatísticos, para verificar qual das hipóteses é verdadeira. A estatística de varrimento espacial (*spatial scan statistics*) proposta por Kulldorff (1997), é um teste estatístico de razão de máxima verosimilhança, em que uma coleção de círculos de raio variado, varre a área geográfica rastreada, para detetar eventuais conglomerados (*clusters*) de doença. Este teste é presentemente considerado uma das ferramentas estatísticas mais robustas para identificar *clusters* de doença (Costa & Kulldorff, 2009).

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo determinar a prevalência de *B. besnoiti* em explorações bovinas em Portugal continental e identificar potenciais *clusters* espaciais de infeção, utilizando para tal um modelo bayesiano e a estatística de varrimento espacial.

2. Material e métodos

2.1 Plano de amostragem

Com o estudo transversal descritivo pretendeu-se determinar a prevalência da besnoitose bovina no país, caracterizar a população afetada e avaliar os limites geográficos de expansão da infeção. Para tal, foi necessária uma amostra representativa da população bovina. Esta população é rastreada ao abrigo de programas de vigilância e erradicação de diversas doenças infecciosas, como a brucelose e a leucose, donde resulta uma coleção representativa de soros que são regularmente obtidos e concentrados em diversos laboratórios. O plano de amostragem para rastreio da besnoitose bovina utilizado neste estudo baseou-se num processo de amostragem por conglomerados, em duas etapas (Jordan & McEwen, 1998). Esta técnica pressupõe a amostragem das explorações, seguida da amostragem do número de animais necessário para detetar a doença, mantendo um determinado valor de sensibilidade

(Se) ao nível da exploração. O número de explorações a incluir no estudo foi calculado com o software epidemiológico EpiTools (Sergeant, 2014), utilizando os seguintes pressupostos: 1) uma prevalência de explorações infetadas de 1,9%, baseada nos valores obtidos num estudo anterior (Waap, Cortes & Leitão, 2010); 2) uma Se do diagnóstico ao nível da exploração de 90%; 3) um universo de 51586 explorações bovinas (Plano de erradicação da brucelose bovina, 2012); 4) um nível de confiança de 95%; 5) um erro na estimativa de 5%. Estes requisitos resultaram numa amostra mínima de 245 explorações bovinas. Para assegurar uma cobertura geográfica representativa, a amostra foi estratificada por região administrativa NUTS 2 de Portugal continental e o número de explorações a amostrar calculado proporcionalmente ao número de explorações em cada uma das regiões. As explorações foram de seguida selecionadas aleatoriamente de um quadro amostral, compreendendo o conjunto de explorações intervencionadas no âmbito do programa nacional de rastreio da brucelose bovina em cada região. O tamanho mínimo da amostra em cada exploração foi determinado de acordo com Dohoo Martin e Stryhn (2003), de forma a garantir uma Se mínima ao nível da exploração de 90% (HSe), considerando a Se e Sp do B-MAT e assumindo uma prevalência intraexploração de 20%.

Projeto de colaboração com a DGAV

O rastreio das explorações de bovinos foi efetuado com autorização da Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV), solicitada em outubro de 2011. A DGAV confirmou a disponibilização das amostras de soros recolhidos ao abrigo do plano de erradicação da brucelose e, com base na listagem das explorações selecionadas, identificou os laboratórios de diagnóstico para os quais são canalizadas as amostras e que, por conseguinte, passariam a estar envolvidos no rastreio da besnoitiose bovina. O projeto foi divulgado pela DGAV junto dos diretores de serviços veterinários das regiões Norte, Centro, Lisboa, Alentejo e Algarve para obter a colaboração dos respetivos laboratórios. Neste estudo participaram os laboratórios ACOS, Alcains, Assisvet, Coprapec, DRAALG, Évora, Guarda, LMV, Proleite, Segalab, Viseu e DRAPNorte.

Colheita dos soros

As amostras de sangue foram colhidas pelos médicos veterinários das OPP nas respetivas áreas de intervenção, no âmbito das campanhas de erradicação da brucelose e enviadas para os laboratórios regionais entre os meses de março de 2012 e maio 2013. Nos laboratórios prepararam-se alíquotas dos soros provenientes das explorações selecionadas, que foram congeladas a -20 °C até ao envio para as nossas instalações. Todavia, no curso de

2012, embora todos os laboratórios participassem no estudo, foram-nos apenas enviadas amostras de 121 das 245 explorações listadas. Para não comprometer a representatividade do número de explorações e concelhos rastreados, reviu-se o plano de amostragem no final do ano e solicitou-se aos laboratórios o envio de novas amostras aleatórias, de concelhos diferentes, até maio de 2013. Relativamente à região do Algarve, só nos foi possível obter amostras do concelho de Aljezur, uma vez que o Algarve foi considerado oficialmente indenne de brucelose, estando a amostragem no âmbito do plano de erradicação da brucelose limitada a um concelho por ano. Até ao final de maio de 2013 recebemos amostras de soro de um total de 402 explorações. Destas, 228 cumpriam o critério de HSe $\geq 90\%$, enquanto nas restantes 174 explorações, o número de animais não permitia atingir o mesmo nível de sensibilidade. Para maximizar a representação geográfica dos concelhos na nossa amostra, todas as explorações pertencentes ao mesmo concelho e que não cumpriam o critério de sensibilidade de 90% foram agregadas em “super-explorações”, assumindo que os animais nas pequenas explorações na mesma área geográfica são criados sob condições de manejo semelhantes. As super-explorações resultantes desta agregação ao concelho em que o número de animais continuava a ser demasiado pequeno para garantir o nível de sensibilidade estipulado, foram excluídas da amostra. Os dados relativos à identificação animal, idade, tamanho e localização da exploração foram registados durante as campanhas sanitárias e encontravam-se disponíveis para o efeito do presente estudo. A informação relativa ao tamanho do efetivo à data da colheita das amostras de sangue foi obtida por consulta da base de dados do programa informático PISA. Para testar a associação entre a idade e a presença da infeção, definiram-se três classes etárias: <24 meses, 24-48 meses e >48 meses.

2.2 Rastreio serológico

A infeção por *B. besnoiti* foi determinada por uma estratégia de testes serológicos em série, utilizando o B-MAT como prova de rastreio e a IFI como teste de confirmação. Estas provas foram realizadas como descrito no capítulo anterior. Em cada ensaio, incluiu-se um soro controlo positivo de um animal com quistos dérmicos e um soro controlo negativo, de um animal proveniente de uma região não endémica e negativo por IFI. Em estudos anteriores, o B-MAT tinha mostrado uma sensibilidade de 97,2% (Intervalo de Confiança (IC): 94,1-100%) e uma especificidade de 99,3% (IC: 98,4-100%) (Waap *et al.*, 2011) e a IFI uma sensibilidade de 91,9% (IC: 81,5-97,0%) e uma especificidade de 100% (IC: 98,8-100%) (Schares *et al.*, 2010). Os taquizoítos de *B. besnoiti* utilizados na preparação do antigénio do B-MAT e da IFI, foram propagados em células Vero a partir do isolado Bb1Evora03,

proveniente de um bovino naturalmente infetado (Cortes *et al.*, 2006a). No rastreio serológico pelo B-MAT, definimos a diluição 1:150 como *cut-off* de seropositividade, de acordo com o procedimento descrito no capítulo I. A aglutinação dos taquizoítos sob a forma de uma opacidade difusa cobrindo pelo menos metade do fundo do poço foi interpretada como uma reação positiva e a sedimentação sob a forma de botão ou anel, como um reação negativa. Todas as amostras com serologia positiva ou duvidosa foram confirmadas pela técnica de imunofluorescência indireta (IFI) na diluição 1:256, de acordo com (Shkap *et al.*, 2002). A presença de fluorescência na totalidade da periferia dos taquizoítos foi considerada uma reação positiva e a fluorescência parcial, apical ou ausente uma reação negativa. Consideraram-se positivas as explorações em que pelo menos um animal apresentou um resultado positivo pelas duas técnicas. Os títulos pela prova de B-MAT foram determinados para todos os soros positivos.

2.3 Inquéritos epidemiológicos nas explorações positivas

Os inquéritos epidemiológicos nas explorações positivas destinaram-se a avaliar a situação clínica dos animais serologicamente positivos e implementar um questionário em entrevista direta com o proprietário da exploração ou com médico veterinário responsável. As visitas foram acompanhadas pelos Médico Veterinários (MV) oficiais das respetivas Direções de Serviços de Alimentação e Veterinária Regionais (DSAVR). As DSAVR disponibilizaram-nos também a informação do Sistema Nacional de Identificação e Registo de Bovinos (SNIRB) relativamente à origem e movimentação dos animais positivos identificados nas diferentes explorações. Na entrevista com os proprietários/MV foram colhidos dados epidemiológicos relacionados com o tipo de exploração, o manejo e a situação clínica dos animais relativamente ao seu estado de infeção:

1 - Caracterização da exploração

- Localização geográfica, aptidão (carne/leite) e regime (intensivo/extensivo/semi-intensivo)
- Efetivo bovino, animais domésticos e animais silváticos em contato

2 - Maneio

- Tipo alojamento verão e inverno
- Alimentação verão e inverno
- Reprodução (inseminação e/ou monta natural)
- Reposição fêmeas (autorreposição/compra)
- Partos (todo o ano/sazonais)

- Problemas fertilidade
- Medidas profiláticas (controlo roedores/insetos, uso vedações)
- 3 - Observação clínica dos animais
- 4 - Análise da movimentação dos animais positivos

2.4 Análise de dados

Análise Bayesiana

Para estimar a prevalência de explorações infetadas e a prevalência média intraexplorações, empregámos um modelo bayesiano desenvolvido para planos de amostragem por conglomerados em duas etapas, utilizando dois testes em sequência (Branscum, Gardnerb & Johnson, 2004). As prevalências ao nível da exploração foram modeladas como distribuições mistura, para permitir a incorporação de explorações com prevalência zero. Isto significa que a prevalência intraexploração de uma exploração ao acaso (infectada ou não) foi modelada com base na distribuição da prevalência em explorações infectadas (contínua) e na probabilidade de uma exploração estar infectada. As distribuições *a priori* foram determinadas com base em estudos prévios e na informação fornecida por peritos na matéria (Tabela 6). As constantes α e β das distribuições beta foram determinadas com base nas modas definidas *a priori* para os parâmetros de interesse e o 5º e 95º percentis de valores possíveis. As modas *a priori* e o 5º percentil utilizados para modelar os parâmetros de desempenho das provas foram derivados dos valores de sensibilidade e especificidade e dos limites inferiores dos intervalos de confiança determinados anteriormente para o B-MAT (Waap *et al.*, 2011) e para a IFI (Schaes *et al.*, 2010) (Tabela 6).

Tabela 6. Informação *a priori* e distribuição de probabilidades para o desempenho dos testes, prevalência de explorações infetadas e prevalência intra-exploração.

Parâmetro	Priors	Distribuições de probabilidades (α , β)
Se B-MAT	0,972 (>0,941) ^a	beta (163,464; 5,680)
Sp B-MAT	0,993 (>0,984) ^a	beta (561,151; 4,948)
Se IFI	0,919 (>0,815) ^a	beta (49,929; 5,312)
Sp IFI	1,00 (>0,988) ^a	beta (248,144; 1,000)
Preval. explorações infetadas	0,019 (<0,055) ^b	beta (4,00; 153,000)
Preval. intraexploração média	0,20(>0,01) ^b	beta (0,481; 0,222)
Variabilidade da prev. intraexploração média	<0,700 ^c e <0,950 ^c	gamma (7,090; 1,376) gamma (0,500; 0,500)

^a moda e 5º percentil, ^b moda e 95º percentil, ^c 95º percentil

A moda e o 95º percentil para a prevalência de explorações infetadas foram inferidos

dos dados de prevalência e respetivos intervalos de confiança obtidos num estudo-piloto de rastreio de *B. besnoiti*, efectuado em 2010 (Waap *et al.*, 2010). Este estudo foi realizado com 1835 soros de bovino colhidos em 155 explorações e os testes B-MAT e IFI foram igualmente aplicados em série, obtendo-se uma prevalência de explorações infetadas de 1,9% (95% CI: 0,7%-5,5%). A informação prévia relativa à média da prevalência intra-exploração e da variabilidade da média foi acertada entre os membros do grupo de trabalho, baseado na experiência de 10 anos no estudo da besnoitose bovina em Portugal. A variabilidade da média da prevalência intraexploração foi modelada com uma distribuição gama. Para calcular as constantes α e β da distribuição gama, os autores indicaram os 95^{os} percentis, para os quais tinham 50% e 99% de certeza que a prevalência intraexploração não era excedida (Tabela 6). O modelo foi implementado no software WinBUGS de acordo com Branscum *et al.* (2004), utilizando o amostrador de Gibbs para encontrar as probabilidades posteriores mais adequadas, dada a informação prévia e os dados observados no estudo. O modelo foi corrido durante 50 000 iterações de Monte Carlo, depois de descartar as primeiras 10 000 iterações, para permitir a convergência do modelo para os verdadeiros valores dos parâmetros de interesse. A convergência do modelo foi avaliada por exame visual dos traçados gráficos. Os limites superiores e inferiores dos intervalos de credibilidade foram fixados no 2,5^o e 97,5^o percentil das distribuições das probabilidades posteriores.

Análise univariada

As diferenças na prevalência de anticorpos anti-*B. besnoiti* entre os diferentes grupos etários, sexo e tamanho da vacada foram analisadas com o teste qui-quadrado.

Análise espacial

As explorações não agregadas foram geocodificadas ao nível da unidade administrativa mais pequena, a freguesia, e as explorações agregadas (super-explorações) ao nível do concelho. Os centróides de cada freguesia ou concelho foram determinados utilizando o software gratuito Quantum Geographic Information System (QGIS). A aglomeração espacial de explorações positivas foi analisada utilizando a estatística de varrimento espacial proposta por Kulldorf (1997). Os procedimentos estatísticos foram realizados no software gratuito SaTScan software, utilizando um modelo de Bernoulli. Consideraram-se os seguintes dados para análise: o número de explorações, o número de explorações com pelo menos um animal positivo e as coordenadas cartesianas dos centróides de cada freguesia/concelho incluídos no estudo. Para assegurar o poder estatístico, implementou-se o modelo fixando o tamanho máximo do *cluster* em 50% do total da população em estudo (valor assumido por defeito pelo

programa). O parâmetro tamanho máximo foi de seguida reduzido para 10%, para verificar a existência de áreas de risco extremamente pequenas, possivelmente mascaradas pela janela de varrimento de 50%. O número de replicações de Monte Carlo para estimar a significância estatística do aglomerado mais provável foi fixado em 9999 iterações. Considerou-se estatisticamente significativo um valor $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1 Resultados descritivos

No total, analisámos uma amostra de 11477 soros de bovino. O rastreio cobriu as cinco regiões NUTS II de Portugal continental. Os soros incluídos na análise estatística foram colhidos num total de 391 explorações em 220 freguesias e 83 concelhos (Tabela 7). A identificação das freguesias e concelhos amostrados encontra-se no Anexo 3. O número de explorações amostradas correspondeu a aproximadamente 0,8% das explorações bovinas em Portugal continental e o número de animais a cerca de 1% do efetivo bovino (plano de erradicação da brucelose bovina, 2012). Para assegurar uma sensibilidade ao nível da exploração de 90%, agregámos 151 explorações em 17 “super-explorações”, ao nível do concelho. Assim, todos os cálculos de prevalência e análise espacial foram efetuados considerando um total de 257 explorações em 166 freguesias. O número de animais, explorações, freguesias e concelhos amostrados por região NUTS 2, antes e depois da agregação em “super-explorações” e as respetivas prevalências são mostradas nas Tabelas 7 e 8.

Tabela 7. Número de explorações e freguesias amostradas e respetivas prevalências (%) por região NUTS2, antes da agregação das explorações ao nível do concelho.

	Norte	Centro	Lisboa	Alentejo	Algarve	Total
Explorações (%)	234 (2,1)	63 (3,2)	3 (33,3)	66 (25,8)	25 (0,0)	391 (6,4)
Freguesias (%)	115 (1,7)	48 (4,2)	2 (50%)	51 (29,4)	4 (0,0)	220 (9,1)

Tabela 8. Número de animais, explorações, freguesias e concelhos amostrados e respetivas prevalências (%) por região NUTS2, após agregação das explorações ao nível do concelho.

	Norte	Centro	Lisboa	Alentejo	Algarve	Total
Animais (%)	2665 (0,9)	2195 (0,4)	106 (0,9)	6283 (5,1)	198 (0,0)	11447 (3,1)
Explorações (%)	113 (4,4)	56 (3,6)	3 (33,3)	66 (25,8)	19 (0,0)	257 (9,7)
Freguesias (%)	68 (2,9)	42 (4,8)	2 (50,0)	51 (29,4)	3 (0,0)	166 (12,7)
Concelhos (%)	29 (6,9)	24 (8,3)	2 (50,0)	27 (44,4)	1 (0,0)	83 (20,5)

O número de animais amostrados por concelho variou entre 5 e 698 animais (Figura 10). Por exploração, testámos um número médio de 44,7 animais. As explorações amostradas apresentavam uma dimensão média de 326,7 animais, variando entre 5 e 4328 animais. Os dados de nascença e sexo encontravam-se disponíveis para 11221 e 11244 animais, respetivamente. A idade média dos animais no rastreio foi de 70,8 meses, variando entre 1-279 meses. Dos 11477 animais testados, 355 (3,1%) foram positivos por B-MAT e IFI. Pelo menos um animal positivo foi detetado em 25 das 257 explorações consideradas para análise.

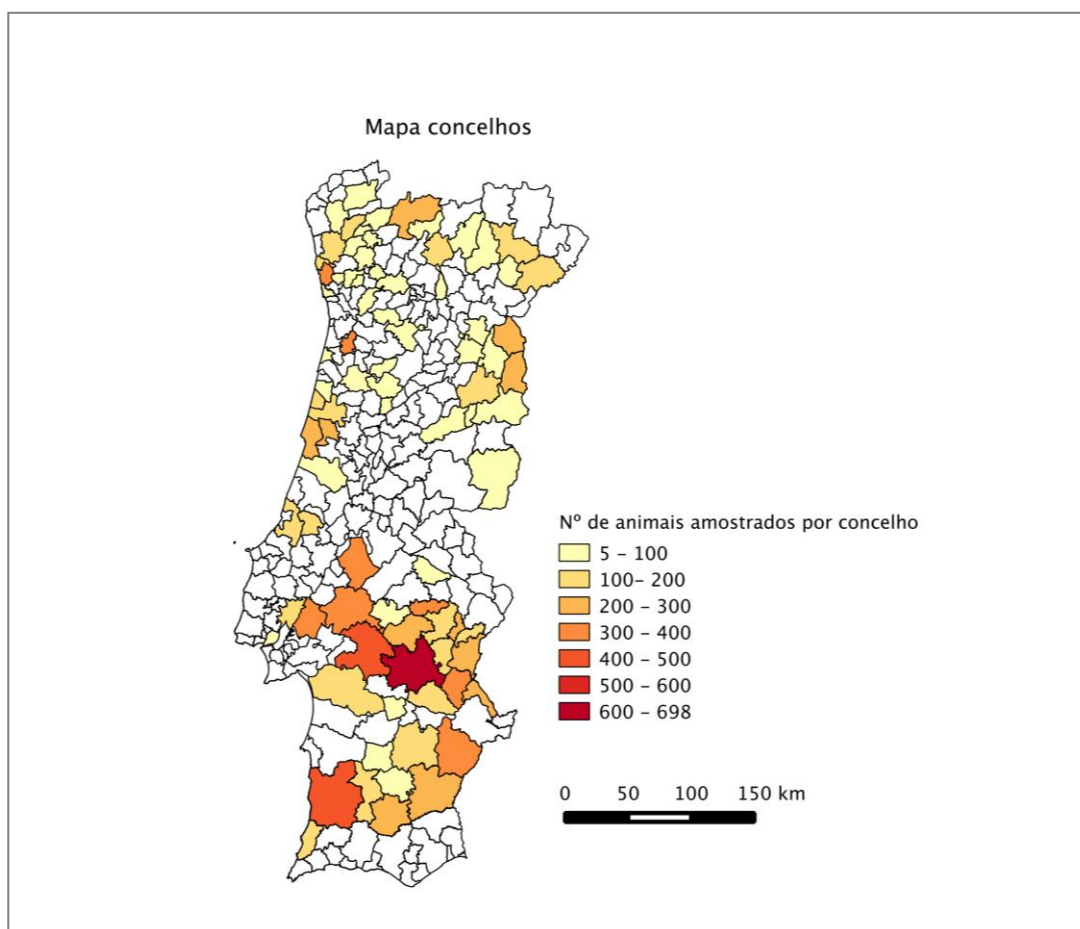


Figura 10. Mapa e número de animais amostrados por concelho.

Identificaram-se explorações positivas em 17 concelhos. As freguesias e concelhos positivos, bem como os dados referentes ao número de animais testados e respetivas prevalências encontram-se na Tabela 8. Dois concelhos pertencem à região Norte, 2 à região Centro, 1 à região Lisboa e 12 à região Alentejo. Os concelhos onde se detetou uma maior prevalência de animais positivos localizam-se na região Alentejo, com destaque para o concelho de Redondo (42,7%), seguido de Arraiolos (25,1%), Reguengos de Monsaraz (20,3%) e Estremoz (20,3%) e na região Norte, o concelho de Valpaços (25,9%) (Figura 11).

Tabela 9. Freguesias e concelhos positivos, nº de animais testados, nº de animais positivos e respetivas prevalências (%).

NUT2	Concelhos	Freguesias	Animais Concelhos	Animais freguesia	Pos.	(%) Concelhos	(%) Freguesias	
Norte	Valpaços	Bouçoães	27	14	7	25,9	50,0	
	Montalegre	Pitões das Júnias	284	92	18	6,3	19,6	
Centro	Trancoso	Rio de Mel	39	39	4	10,3	10,3	
	Idanha-a-Nova	Monfortinho	80	15	4	5,0	26,7	
Lisboa	Vila Franca de Xira	Alverca do Ribatejo	101	101	1	1,0	1,0	
Alentejo	Redondo	Redondo	110	110	47	42,7	42,7	
	Arraiolos	Gafanhoeira	223	103	56	25,1	54,4	
	Reguengos de Monsaraz	Campo	349	208	71	20,3	34,1	
	Estremoz	Veiros	192	82	39	20,3	47,6	
	Évora	Nossa Sra. da Graça do Divor Nossa Sra. da Tourega Sé e São Pedro			147	1		0,7
			698	201	58	8,6	28,9	
					240	1		0,4
	Chamusca	Carregueira	320	60	15	4,7	25,0	
	Benavente	Samora Correia	350	120	10	2,9	8,3	
	Vila Viçosa	Ciladas	110	110	3	2,7	2,7	
	Montemor-o-Novo	Cabrela			285	9		3,2
		Santiago do Escoural		457	172	3	2,6	1,7
	Alandroal	Alandroal	233	137	5	2,1	3,6	
Mourão	Mourão	202	110	1	0,5	0,9		
Coruche	Biscaíño	294	243	1	0,3	0,4		
Borba	Orada	314	72	1	0,3	1,4		

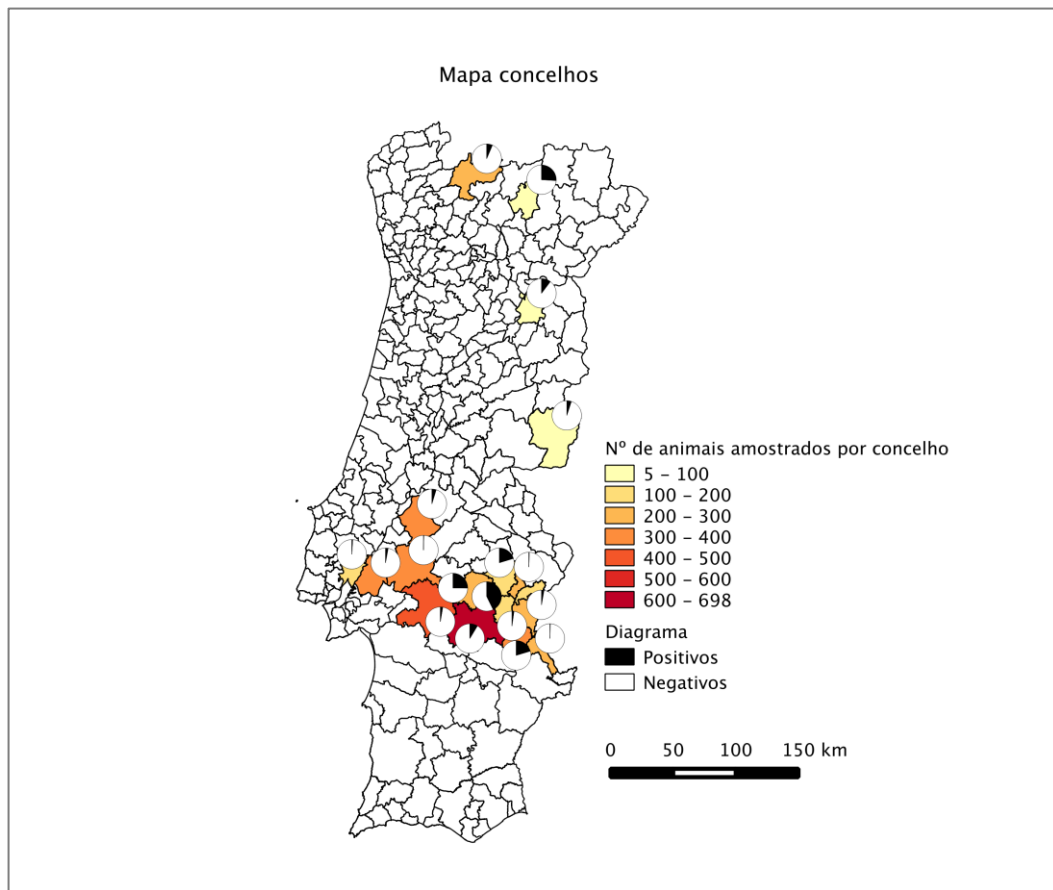


Figura 11. Mapa dos concelhos positivos, número de animais amostrados e representação gráfica da proporção de animais positivos por concelho.

A prevalência intraexploração nas explorações positivas variou entre 0,7% e 72,4%, sendo que cerca de metade das explorações positivas apresentava prevalências $\leq 10,3\%$ (Figura 12).

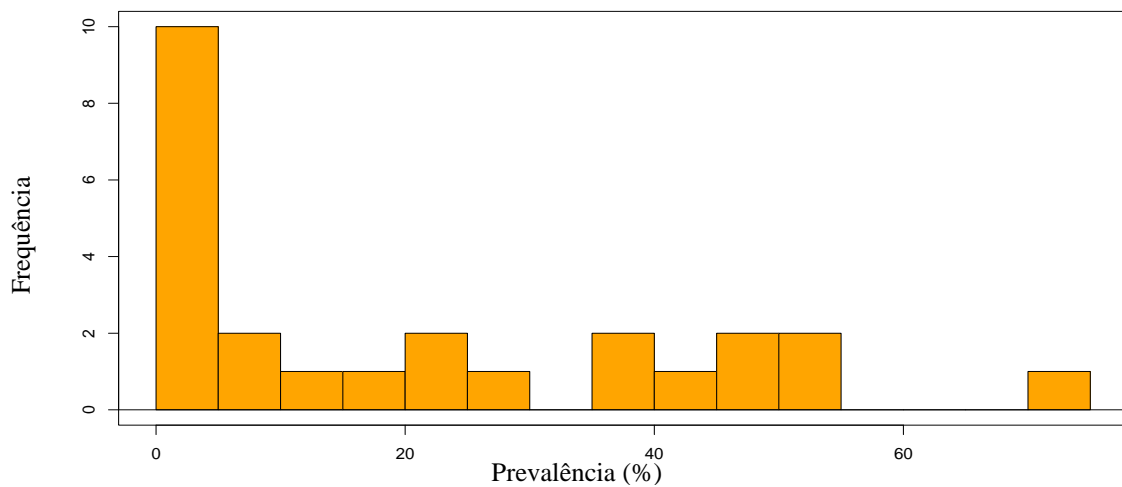


Figura 12. Histograma da prevalência intraexploração

Para a prevalência média intraexploração calcularam-se valores de 19,7% na região Norte, 18,5% na região Centro e 20,0% na região Alentejo. Na região de Lisboa, detetou-se apenas uma exploração positiva, com uma prevalência intraexploração de 1,7%.

Relativamente às classes etárias, observou-se um aumento significativo da prevalência dos animais mais jovens para os mais velhos ($P < 0,0001$). As diferenças de prevalência encontradas entre machos e fêmeas não foram significativas ($P > 0,05$). A proporção de animais positivos foi mais elevada nos efetivos com 84-167 animais em comparação com a de outras categorias de tamanho do efetivo (Tabela 9).

Tabela 10. Seroprevalência de anticorpos anti-*B.besnoiti* de acordo com o sexo, grupos etários (meses) e tamanho da vacada e respetivos valores-p.

Variável	Categoria	Número de animais	Seroprevalência (%)
Sexo	Machos	309	3,2
	Fêmeas	10935	3,1
Idade (meses)	<24	1423	0,3
	24-48	3016	1,4
	>48	6782	4,5
Tamanho efetivo	Q 1 ^a (5-83)	2877	1,1
	Q 2 (84-167)	2870	5,2
	Q 3 (168-307)	2859	3,6
	Q 4 (308-4328)	2841	2,6

^aQ-Quartil

A titulação dos soros positivo pelas prova de B-MAT e confirmados por IFI resultou nos seguintes títulos B-MAT: 150 (n=69), 450 (n=90), 1350 (n=67), 4050 (n=65), 12150 (n=43), 36450 (n=17), 109350 (n=4) (Figura 13).

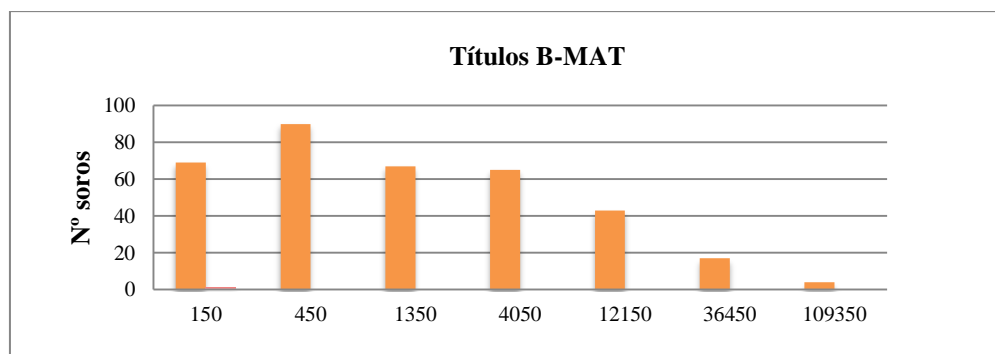


Figura 13. Títulos B-MAT dos soros positivos pelas técnicas B-MAT e IFI.

3.2 Análise bayesiana

A prevalência de explorações infetadas, a prevalência média intraexploração, bem como a sensibilidade e especificidade do B-MAT e da IFI, foram calculadas por métodos bayesianos. Para a verdadeira prevalência de explorações infetadas estimámos um valor de 5,1% [Intervalo de Credibilidade: 3,1%-7,8%] e para a prevalência média intraexploração um valor de 33,0% [Intervalo de Credibilidade: 20,3%-46,0%]. A sensibilidade e especificidade do B-MAT e da IFI foram calculadas em 96,9% [Intervalo de Credibilidade: 93,7%-98,8%] e 99,7% [Intervalo de Credibilidade: 99,6%-99,8%], enquanto que para a IFI se determinaram valores de 89,6% [Intervalo de Credibilidade: 86,0%-92,5%] e 99,7% [Intervalo de Credibilidade: 99,6%-99,8%], respetivamente. A utilização de diferentes *priors* na análise de sensibilidade mostrou que as distribuições posteriores eram mais influenciadas pelos dados do estudo que pelos *priors* escolhidos, confirmando a robustez dos resultados estimados pelo modelo. As distribuições posteriores da prevalência de explorações infetadas e da prevalência média intraexploração encontram-se representadas nas figuras A e B. As distribuições *a priori* foram incluídas nos gráficos para comparação (Figura 14).

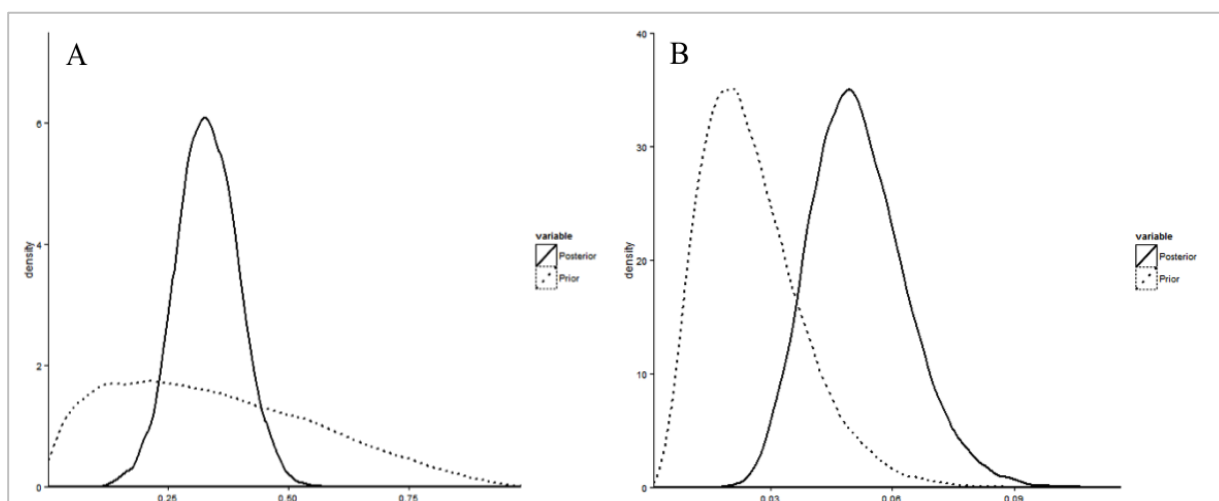


Figura 14. A - Distribuições *a priori* e posteriores da prevalência média intraexploração; B - distribuições *a priori* e posteriores da prevalência nas explorações.

3.3 Análise espacial

A utilização de uma janela de varrimento pré-definida incluindo 50% da população total em risco, gerou um *cluster* significativo ($P < 0,0001$), enquanto que a utilização de uma janela com 10% da população total em risco resultou em múltiplos pequenos *clusters* não significativos. A janela do *cluster* mais provável, com um raio de 86 km, estende-se sobre 361 freguesias em 64 concelhos, localizados sobretudo no Alto Alentejo, Alentejo Central e

margem sul da região Lisboa (Figura 15). A área coberta pelo *cluster* inclui 18 explorações seropositivas, quando, sob a hipótese nula, se esperariam 4,9 explorações caso.

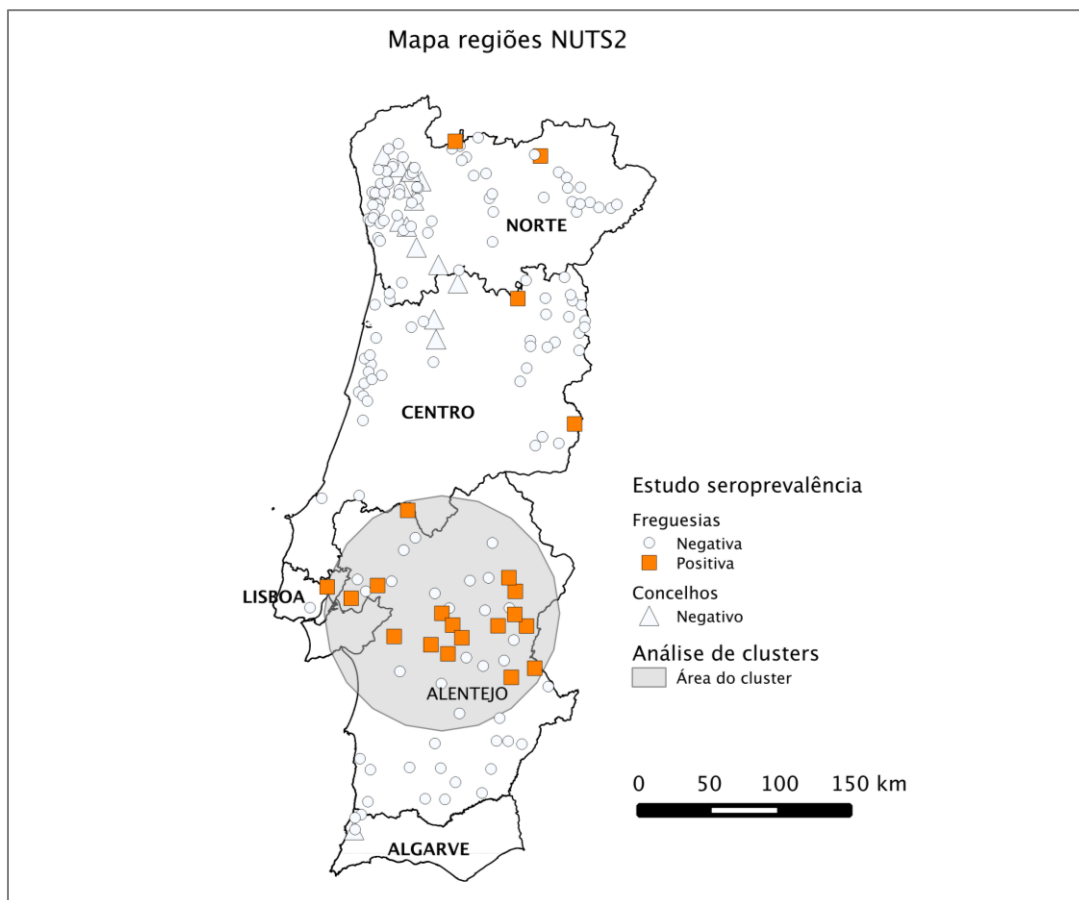


Figure 15. Distribuição geográfica das freguesias e concelhos amostrados em cada região NUTS 2.

3.4 Visitas e inquéritos epidemiológicos nas explorações seropositivas

Dado os limitados recursos, não nos foi possível deslocar-nos a todas as explorações positivas identificadas no estudo. Assim, uma vez que a doença nunca tinha sido descrita fora da região do Alentejo, o foco da nossa atenção foram as explorações localizadas a norte do rio Tejo. Adicionalmente, visitámos quatro explorações localizadas na região Alentejo com prevalências variadas de besnoitiose bovina.

Caracterização das explorações

No rastreio serológico da infeção foram identificadas sete explorações positivas localizadas fora do perímetro do *cluster*. As explorações em questão pertencem aos concelhos de Idanha e Trancoso, na região Centro, e aos concelhos de Valpaços e Montalegre, na região Norte. O inquérito epidemiológico foi implementado nestas 7 explorações e em mais 5

explorações positivas, 4 na região Alentejo (Avis, Ponte de Sôr, Chamusca e Benavente) e na única exploração positiva na região Lisboa (Vila Franca de Xira). As explorações em Avis e Ponte de Sôr já eram conhecidas anteriormente ao rastreio e correspondem a explorações com casos clínicos identificados.

Quanto ao manejo produtivo, todas as explorações visitadas eram de aptidão carne. O regime de produção dos animais nas explorações no Alentejo, Idanha e Trancoso era extensivo, ao passo que nos concelhos de Montalegre e Valpaços poderá ser considerado semi-intensivo, uma vez que a alimentação era suplementada e os animais recolham aos estábulos à noite. A exploração no concelho de Vila Franca de Xira tinha um sistema de produção intensivo (Tabela 10). Quanto ao tamanho dos efetivos, com exceção das explorações em Avis, Ponte de Sôr, Benavente e Idanha, todas as explorações eram de pequena dimensão, com 14-85 animais.

Tabela 11. Localização das explorações visitadas, regime de produção, aptidão, tamanho do efetivo, nº de animais testados e prevalências (%) encontradas.

Inquéritos	Concelho	Freguesia	Aptidão	Regime	Total efetivo	Nº testados	(%)
1	Avis	Malarranha	Carne	Extensivo	194	194	79,9
2	Ponte de Sôr	Maranhão	Carne	Extensivo	900	900	21,3
3	Valpaços	Bouçoães	Carne	Semi-Int.	14	14	50
4	Montalegre	Pitões das Júnias	Carne	Semi-Int.	26	26	3,8
5	Montalegre	Pitões das Júnias	Carne	Semi-Int.	33	17	35,3
6	Montalegre	Pitões das Júnias	Carne	Semi-Int.	21	21	38,1
7	Montalegre	Pitões das Júnias	Carne	Semi-Int.	16	14	21,4
8	Idanha	Monfortinho	Carne	Extensivo	506	15	26,7
9	Trancoso	Rio de Mel	Carne	Extensivo	43	39	10,3
10	Benavente	Samora Correia	Carne	Extensivo	4328	120	8,3
11	Vila Franca de Xira	Alverca	Carne	Intensivo	77	59	1,7
12	Chamusca	Carregueira	Carne	Extensivo	85	60	17,6

Nas explorações em Benavente e Idanha, os animais positivos pertenciam a lotes com cerca de 200 animais. Na exploração em Ponte de Sôr, testámos 5 lotes com 49-434 animais e todos apresentavam animais positivos. Relativamente à possibilidade de contacto com outras espécies animais domésticas, nenhum dos produtores possuía ovelhas ou cabras e apenas uma das explorações tinha porcos. Um dos inquiridos mencionou o contacto com cabras de uma exploração vizinha. O contacto com equídeos, foi referido por 5 dos inquiridos, o contacto com cães por 8 e o contacto com gatos por 6 dos inquiridos. O contacto com aves domésticas (galinhas) foi indicado apenas por um dos inquiridos (Tabela 11).

Tabela 12. Animais domésticos (n) em contacto com os bovinos nas explorações visitadas.

Inquéritos												
Animais	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Ovinos	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
Caprinos	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	Não
Suínos	Não	Não	Não	11	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
Equídeos	Não	Não	Não	1	1	5	Não	Não	1	21	Não	Não
Cães	3	Não	Não	3	3	1	1	Não	2	10	Não	**
Gatos	3	Não	Não	2	3	3	1	Não	1	Não	Não	Não
Aves dom.	Sim*	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não

* galinhas; ** possibilidade de contacto

Com exceção do produtor da exploração em Vila Franca de Xira, de regime intensivo, todos os produtores admitiram a possibilidade de contacto com animais de vida silvática. O javali e a raposa, mencionados por 10 e 9 produtores, respetivamente, foram as espécies encontradas com maior frequência. Oito dos inquiridos consideraram os javalis muito frequentes (Tabela 12). A possibilidade de contacto com gatos selvagens foi referida por todos os produtores das explorações no Alentejo, por 2 produtores no concelho de Montalegre e pelo proprietário da exploração em Trancoso. A existência de cegonhas foi assinalada em duas das explorações na região Alentejo, numa exploração no concelho de Montalegre e nas explorações em Idanha e Trancoso. A presença de saca-rabos foi mencionada nas três explorações no Alentejo e nas explorações em Idanha e Trancoso. Três produtores no concelho de Montalegre e o proprietário da exploração em Trancoso mencionaram o lobo ibérico. O toirão, o ginete, o texugo e a doninha foram as espécies menos observadas (Tabela 12).

Tabela 13. Animais silvestres em contacto com os bovinos nas explorações visitadas.

Inquéritos												
Animais	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Gato bravo	Sim	Sim	---	Sim	---	---	Sim	---	Sim	Sim	---	NS
Javalis	Sim ⁺	Sim ⁺	Sim	Sim ⁺	Sim	Sim ⁺	Sim ⁺	Sim ⁺	Sim ⁺	Sim ⁺	---	NS
Cegonhas	---	Sim ⁺	Sim	---	Sim	---	---	Sim	Sim	Sim ⁺	---	NS
Toirão	---	---	---	---	Sim	Sim	---	---	---	---	---	NS
Saca-rabos	Sim	Sim ⁺	---	---	---	---	---	Sim	Sim	Sim ⁺	---	NS
Ginete	---	---	---	---	Sim	---	---	---	Sim	Sim	---	NS
Raposas	Sim	Sim ⁺	---	Sim ⁺	Sim	Sim ⁺	Sim	Sim	Sim	Sim	---	NS
Texugos	Sim	---	---	---	---	---	---	Sim	---	Sim	---	NS
Lobo	---	---	---	---	Sim	Sim	Sim ⁺	---	Sim ⁺	---	---	---
Doninha	---	---	---	---	Sim	---	---	---	---	---	---	NS

--- ausente ou muito pouco frequente; + muito frequente; NS- Não sabe precisar, mas admite contacto

Maneio

Relativamente ao alojamento, nas explorações no Alentejo, Idanha e Trancoso os animais eram mantidos na pastagem, tanto no verão, como no inverno. Em Valpaços ficavam num cercado com cobertura, em Vila Franca de Xira, em parques e em Montalegre eram levados para os montes e lameiros durante o dia, recolhendo à noite aos estábulos.

A alimentação era característica do sistema produtivo, baseando-se essencialmente no pasto para os animais criados em extensivo e semi-intensivo e em pasto cortado no sistema intensivo. A suplementação com pasto cortado, silagem ou ração era feita consoante as necessidades, sendo a ração administrada sobretudo aos animais destinados à engorda (Tabela 13).

No que diz respeito à reprodução, 7 das explorações visitadas usavam apenas a monta natural, 3 a monta natural e a inseminação artificial e duas exclusivamente a inseminação artificial. A reposição do efetivo reprodutor era realizada por autorreposição das fêmeas em nove das explorações e por autorreposição e compra do exterior nas restantes. Os partos ocorriam durante todo o ano na maior parte das explorações, somente duas concentravam os partos entre os meses de junho a março. No geral, não foram referidos problemas de fertilidade nas explorações. Apenas um dos produtores mencionou problemas nas fêmeas e um outro nos machos.

Quanto às medidas de prevenção, 8 dos produtores aplicavam regularmente ectoparasiticidas nos animais. O controlo de roedores nas instalações era feito em nove das explorações visitadas, em três com estações de isco/ratoeiras e nas restantes com gatos (Tabela 13).

Observação clínica dos animais

Nenhum dos animais observados, incluindo os animais positivos identificados no rastreio serológico e os animais coabitantes, apresentavam sinais clínicos de besnoitiose bovina.

Análise da movimentação dos animais positivos

Por análise do movimento dos animais positivos no programa SNIRB, verificou-se que as explorações nos concelhos de Valpaços, Montalegre e Vila Franca de Xira tinham história de aquisição de animais provenientes do Alentejo. O único animal positivo identificado na exploração em Vila Franca de Xira era proveniente de Montemor-o-Novo e tinha regressado à exploração de origem, pertencente ao mesmo proprietário.

Tabela 14. Dados de manejo colhidos através do inquérito epidemiológico nas explorações visitadas.

Inquéritos												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Alojamento												
Verão												
Pastagem	X	X	---	X	---	---	---	X	X	X	---	X
Cercado com cobertura	---	---	X	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Parque	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	X	---
Montes/lameiros	---	---	---	X	X	X	X	---	---	---	---	---
Estábulo	---	---	---	X	X	X	X	---	---	---	---	---
Inverno												
Pastagem	X	X	---	---	---	---	---	X	X	X	---	X
Cercado com cobertura	---	---	X	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Parque	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	X	---
Montes/lameiros	---	---	---	X	X	---	X	---	---	---	---	---
Estábulo	---	---	---	X	X	X	X	---	---	---	---	---
Alimentação												
Verão												
Pasto	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	---	X
Pasto cortado	---	---	---	---	---	X	X	X	X	---	X	X
Silagem	---	---	---	---	---	---	---	---	---	X	---	---
Ração	---	---	---	---	X	---	---	X	X*	X	X	X
Inverno												
Pasto	X	X	X	X	X	X	X	---	X	X	---	X
Pasto cortado	X	X	---	X	X	X	X	---	---	---	X	X
Silagem	---	---	---	X	X	---	---	---	---	X	---	---
Ração	X*	X*	X*	X	X	---	---	X	---	X	X	X
Reprodução												
IA/Monta natural	MN	MN	IA	IA/ MN	MN	IA	IA/ MN	MN	IA/ MN	MN	MN	MN
Reposição fêmeas												
Autorreposição	---	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Compra	X	---	---	X	---	---	X	---	---	---	---	---
Partos												
Todo o ano	---	X	X	X	X	X	X	X	X	---	X	X
Sazonais (meses)	6-3	---	---	---	---	---	---	---	---	7-3	---	---
Problemas fertilidade												
Fêmeas	X	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Machos	---	---	---	X	---	---	---	---	---	---	---	---
Medidas profiláticas												
Uso ectoparasiticidas	X	X	---	X	X	X	---	X	X	---	---	X
Controlo roedores	X	X	---	X	X	X	X	X	X	---	---	X
Isco/ratoeiras	X	X	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Gato	---	---	---	X	X	X	X	X	X	---	---	---
Vedações	X	X	X	X	X	X	---	X	X	X	X	X

* engorda

Segundo este, nem o bovino positivo, nem os animais coabitantes na exploração em Montemor-o-Novo evidenciavam sinais clínicos compatíveis com besnoitose bovina. No caso das explorações nos concelhos de Trancoso e Idanha, não foi possível estabelecer qualquer ligação com o Alentejo, em relação aos animais positivos ou coabitantes presentes na exploração.

4. Discussão

Este trabalho teve por objetivo desenvolver um estudo serológico transversal para determinar a prevalência e distribuição geográfica da infeção por *B. besnoiti* nas explorações bovinas em Portugal. Na ausência de um teste de diagnóstico *gold standard*, empregámos diferentes estratégias para aumentar a exatidão das estimativas da prevalência, nomeadamente a aplicação de dois testes serológicos em série e a análise bayesiana dos dados. As provas de B-MAT e IFI utilizadas neste estudo tinham revelado antes, quando avaliadas individualmente, um bom desempenho na detecção de anticorpos anti-*B. besnoiti* em soros de bovinos (Schaes *et al.*, 2010; Waap *et al.*, 2011). Por outro lado, tanto a técnica de aglutinação direta, como a IFI foram superiores a outros testes serológicos no diagnóstico de protozoários filogeneticamente próximos de *B. besnoiti*, como *Toxoplasma gondii* (Dubey, Desmonts, McDonald & Walls, 1985; Dubey *et al.*, 1995; Shaapan, El-Nawawi & Tawfik, 2008) e *Neospora caninum* (Björkman *et al.*, 1994; Packham *et al.*, 1998). Neste estudo, os testes serológicos foram aplicados em série. Todos os animais foram testados primeiro pela técnica de B-MAT, mais sensível, e somente os soros positivos e duvidosos foram confirmados pela IFI, mais específica. Todavia, uma vez que nenhum dos testes pode ser considerado perfeito na determinação do verdadeiro estado da infeção, optámos por utilizar métodos bayesianos para estimar os dados de prevalência e o desempenho dos testes. Os modelos bayesianos são mais robustos face a variáveis não observadas, tais como o verdadeiro estado de doença, na presença de erro de diagnóstico (Dunson, 2001) e têm, por esta razão, sido largamente utilizados para estimar a prevalência e o desempenho dos testes de diagnóstico em termos de sensibilidade e especificidade nos estudos seroepidemiológicos de doenças infecciosas. Neste trabalho, os valores de Se e Sp determinados para o B-MAT (96,9% e 99,7%) e para a IFI (89,6% e 99,7%), diferiram pouco dos valores estimados anteriormente (Tabela 5). Isto mostra que ambos os testes mantêm um desempenho elevado quando aplicados a uma amostra maior e mais representativa da população. Com um custo aceitável na sensibilidade geral, que desceu para 87,8%, a utilização dos testes em série maximizou a especificidade para 99,9%, assegurando a verdadeira detecção da infeção numa maior

proporção de animais com resultados positivos nos dois testes, em comparação com os animais com resultados positivos em cada um dos testes utilizados individualmente. A grande vantagem dos métodos bayesianos residiu na possibilidade de conjugar a informação disponível sobre a prevalência de *B. besnoiti* em Portugal com os dados obtidos no estudo, o que permite estimar os intervalos de credibilidade para a verdadeira prevalência entre e intraexplorações. No geral, os nossos resultados indicam que a infecção por *B. besnoiti* em Portugal continental tem uma prevalência verdadeira em explorações de 5,1% e uma prevalência verdadeira intraexploração de 33,0%, com uma probabilidade de estes valores se situarem num intervalo de credibilidade de 3,1%-7,8% e 20,3%-46,0%, respetivamente. Estes valores vêm atualizar o conhecimento prévio sobre a prevalência de *B. besnoiti* em Portugal, que apontava para uma prevalência em explorações mais baixa, de 1,9%. Apesar de não se poder excluir um aumento da prevalência de *B. besnoiti*, especialmente tendo em conta a expansão da doença para áreas fora do Alentejo, admitimos que os dados anteriores tenham subestimado a verdadeira prevalência da infecção. A deteção de uma prevalência mais elevada resulta provavelmente da implementação de uma estratégia de amostragem mais eficiente, que assegurou uma amostra mais representativa da população bovina. Esta baseou-se num processo de amostragem por conglomerados em duas etapas e na definição de um requisito de sensibilidade ao nível da exploração de 90% para a amostragem intraexploração. A comparação dos resultados de prevalência com outros países é difícil, devido à escassez de estudos seroepidemiológicos realizados até à data, à limitação regional dos dados disponíveis e à falta de padronização de técnicas de diagnóstico. As elevadas percentagens de infecção individual de 50% e 56,3% obtidas respetivamente por Goldman e Pipano (1983) e Neuman (1972) nos primeiros rastreios serológicos realizados em Israel pela técnica de IFI, por exemplo, não são comparáveis com os estudos efetuados mais tarde, uma vez que estes autores utilizaram diluições *cut-off* substancialmente mais baixas (1:16 e 1:64). A ocorrência de reações cruzadas com soros positivos a *N. caninum* na diluição 1:64 viria a ser reportada apenas anos mais tarde (Shkap *et al.*, 2002), sendo o *cut-off* 1:200/1:256 hoje comumente utilizado no rastreio por IFI. Os dados de prevalência e o padrão de aglomeração geográfica observado no presente estudo conflituam com os resultados de estudos seroepidemiológicos realizados noutros países, que apontam para prevalências mais elevadas e uma maior distribuição geográfica. Todos estes estudos foram realizados com testes ELISA comerciais ou com base em protocolos ELISA publicados. No entanto, embora estes testes tenham mostrado um bom desempenho num estudo inter-laboratorial comparativo (García-Lunar *et al.*, 2013), no campo, os elevados valores de prevalência encontrados diminuíram consideravelmente, quando os animais seropositivos foram testados por Western blot. Assim,

as prevalências de 10% e 22,7% determinadas na Suíça (Basso *et al.*, 2013) e Itália (Gazzonis *et al.*, 2014), respectivamente, caíram para 0,3%, após confirmação por Western blot. Na Austrália, os resultados de um kit ELISA comercial (PrioCHECK® Besnoitia Ab 2.0) apontavam para uma prevalência de 18% (Nasir *et al.*, 2012), mas nenhum dos animais foi positivo por Western blot. A prevalência animal de 44,1% e a prevalência de explorações infetadas de 83,0% na Itália (Rinaldi *et al.*, 2013), bem como a prevalência de 13,75% no Egito (Ashmawy & Abu-Akkada, 2013), determinadas pelo mesmo kit comercial ELISA, não foram confirmados por outra técnica. Recentemente, foi expressa preocupação que estas discrepâncias sejam consequência de uma falta de especificidade das provas ELISA disponíveis, o que, a confirmar-se, significa que a prevalência e distribuição da besnoitiose bovina possa ter sido largamente sobre-estimada (Gazzonis *et al.*, 2014). Quanto à distribuição das prevalências intraexploração, neste estudo, cerca de metade das explorações evidenciou um percentagem de animais positivos relativamente baixa ($\leq 10,3\%$), enquanto nas explorações mais infetadas, a prevalência atingiu valores de 72,4%. Os valores mais baixos podem ser explicados, ou pela introdução recente da infeção ou por uma transmissão pouco eficiente da doença na exploração. As prevalências intraexploração elevadas, pelo contrário, podem ser o resultado de um ciclo de transmissão mais eficiente ou uma coabitação de longos anos com a infeção. À semelhança de observações anteriores (Goldman & Pipano, 1983; Fernández-García *et al.*, 2010), não se encontrou nenhuma associação entre prevalência e o género dos animais, mas constatou-se que esta aumentava com a idade. A prevalência mais elevada nos grupos etários mais velhos, é provavelmente consequência de uma exposição prolongada ao parasita. Por outro lado, assumindo que os artrópodes estão implicados na transmissão de *B. besnoiti*, as diferenças físicas, fisiológicas e comportamentais associadas à idade dos animais poderão condicionar a suscetibilidade à transmissão. De facto, sabe-se que os tabanídeos, as glossinas e as moscas *Stomoxys* são atraídas pelo tamanho do hospedeiro e por compostos químicos produzidos pelo próprio animal, em especial o dióxido de carbono, cuja produção aumenta ao longo da sua vida (Konstantinov & Ul'ianov, 1988; Torr, Mangwiro & Hall, 2006). Para além disto, os animais jovens têm mais movimentos defensivos, diminuindo o risco de serem picados (Torr & Mangwiro, 2000; Schofield & Torr, 2002). Curiosamente, a prevalência nos efetivos na categoria 84-167 animais foi superior às outras categorias e a prevalência mais baixa foi encontrada nas explorações com 5-83 animais. Isto poderá fazer sentido do ponto de vista biológico, uma vez que nas doenças transmitidas por vetores, o rácio das densidades de vetores e hospedeiros é crítico na transmissão dos agentes patogénicos (Ross, 1911; Velasco-Hernández, 1994; Kribs-Zaleta, 2010a). Para que a transmissão seja eficaz, é necessário um número mínimo de hospedeiros suscetíveis. Com o

aumento da densidade do efetivo, aumenta também o número de contactos entre os vetores e os animais suscetíveis. No entanto, chegado o ponto em que os hospedeiros são relativamente mais abundantes que os vetores, a transmissão atinge um ponto de saturação e começa a declinar (Pelosse & Kribs-Zaleta, 2012). Os resultados da análise de *clusters* mostram que a infeção está primariamente aglomerada no Alto e Centro Alentejo. Este achado está de acordo com a evidência serológica e clínica da doença em Portugal. A besnoitiose bovina está historicamente associada a esta região desde 1885 (Franco & Borges, 1915, 1916) e até ao final de 2013 todos os casos foram reportados exclusivamente no Alentejo. Os primeiros casos clínicos fora da região do Alentejo foram apenas detetados em 2014, em Idanha-a-Nova e Castelo Branco (Meireles *et al.*, 2014). No presente estudo identificámos cinco explorações positivas no nordeste de Portugal, junto à Fronteira com Espanha, duas explorações na região Centro e uma exploração na região Lisboa. Tratou-se da primeira evidência serológica da infeção por *B. besnoiti* em bovinos fora do Alentejo. As explorações positivas nas regiões Norte, Centro e Lisboa foram visitadas para verificar a presença de animais com manifestações clínicas de besnoitiose bovina. No entanto, nenhum dos animais observados evidenciava quaisquer sinais de doença. A história dos movimentos animais na exploração foi também revista para analisar se os animais positivos ou eventuais coabitantes não incluídos no rastreio serológico, tinham sido adquiridos no Alentejo. Da análise dos movimentos animais concluímos, que todas as explorações na região Norte tinham contactado com animais provenientes do Alentejo no passado. Já nas explorações da região Centro, não se conseguiu estabelecer qualquer ligação. O único animal positivo identificado na região Lisboa era proveniente do Alentejo. Embora o número de explorações visitadas seja insuficiente para estabelecer associações com significado estatístico, observámos um padrão comum no que diz respeito ao manejo do efetivo. Assim, a serologia positiva manifestou-se exclusivamente em animais de aptidão carne, criados em regime extensivo ou semi-intensivo com reprodução natural. Observou-se também que o tamanho do efetivo ou dos lotes positivos, raramente excedia os 200 animais. A maioria dos produtores referiu a possibilidade de contacto com animais de vida silvestre, sobretudo javalis e raposas. A permanência anual ou durante longos períodos de tempo nas pastagens, a proximidade física dos animais nas pequenas explorações ou em lotes, nas grandes explorações, a sobreposição com os habitats de animais silváticos e a exposição prolongada a artrópodes hematófagos aparentam assim ser fatores predisponentes para a infeção. Curiosamente, em nenhuma das explorações foram observadas lesões compatíveis com besnoitiose bovina, nem os produtores se recordavam de ter observado animais com os sinais clínicos típicos da doença. O acompanhamento destas regiões, durante os próximos tempos, é essencial para estabelecer uma ligação entre os dados serológicos e a

evidência clínica da doença. A identificação de explorações positivas, sem qualquer ligação ao Alentejo, sugere que a aquisição de animais infetados desta região pode não ser a fonte exclusiva da introdução da infeção. Igualmente, tendo em consideração que o Alentejo exporta animais para todas as outras regiões, é intrigante que a doença não se encontre mais espalhada pelo país. Isto poderá indicar que, mesmo quando os animais infetados são introduzidos em explorações indemnes, a simples existência de insetos vetores poderá não ser suficiente para estabelecer um ciclo de infeção. Estas observações reforçam a necessidade de explorar o papel desempenhado por outras espécies animais, domésticas ou silváticas, na transmissão de *B. besnoiti*.

Capítulo V - Questionário sobre besnoitiose bovina aos Médicos Veterinários

1. Introdução

O presente questionário foi elaborado no seguimento do rastreio serológico implementado em 2013, destinado a estimar a prevalência e distribuição geográfica da infeção a nível nacional. Neste rastreio, foram identificadas explorações positivas nas regiões Norte e Centro do país, confirmando-se que a infeção se estende para além do Alentejo. Mais recentemente, foram descritos casos clínicos na Beira Interior. Face a esta evidência, considerámos essencial convidar os médicos veterinários (MV) a exercer clínica de bovinos a partilhar a sua experiência de campo, de modo a conhecer a prevalência clínica e a extensão geográfica dos casos de besnoitiose bovina em Portugal, pretendendo-se também avaliar o grau de alerta para a doença. Uma vez que os questionários online oferecem a vantagem de poderem ser divulgados por um grande número de pessoas de diversas zonas geográficas, a baixo custo, optámos por esta metodologia para colher informações junto dos MV.

2. Material e métodos

O questionário foi construído no Google Docs, um pacote de aplicativos gratuito *online* do Google. O link para o formulário foi enviado por correio electrónico para a morada electrónica de todos os MV coordenadores das Organizações de Produtores Pecuários (OPP) em Portugal continental constantes da base de dados da DGAV à data (n=108). Acompanhando este e-mail, foi enviada uma carta introdutória, com a explicação do âmbito e dos objetivos do questionário, na qual se pedia o reencaminhamento do mesmo para os MV executores das OPP. A fim de aumentar a sua divulgação, o questionário foi também enviado a outros colegas direta ou indiretamente envolvidos na clínica de bovinos, com o pedido de reencaminhamento para a rede de conhecimentos de MV na mesma área. O acesso online ao formulário foi mantido durante os meses de janeiro a março.

O questionário foi concebido de forma a poder extrair informações relevantes relativamente à experiência dos inquiridos com a doença e à localização geográfica dos casos observados. O formulário foi dividido em duas partes: uma de respostas exclusivas para os MV familiarizados com a besnoitiose bovina e outra destinada aos MV que conhecem a doença mas que nunca viram casos clínicos e aos que nunca ouviram falar da doença (estes questionários encontram-se no Anexo 4).

3. Resultados

Fechado o acesso *online* ao questionário, obtivemos um total de 80 respostas válidas. Três respostas foram eliminadas por duplicação ou dados incompletos. Relativamente ao grau de informação sobre a doença, 17,5% (14) dos inquiridos já tinham observado casos clínicos, 72,5% (58) tinham conhecimento mas nunca viram animais com sinais clínicos e 10% (8) nunca ouviram falar em besnoitiose bovina (Figura 16).

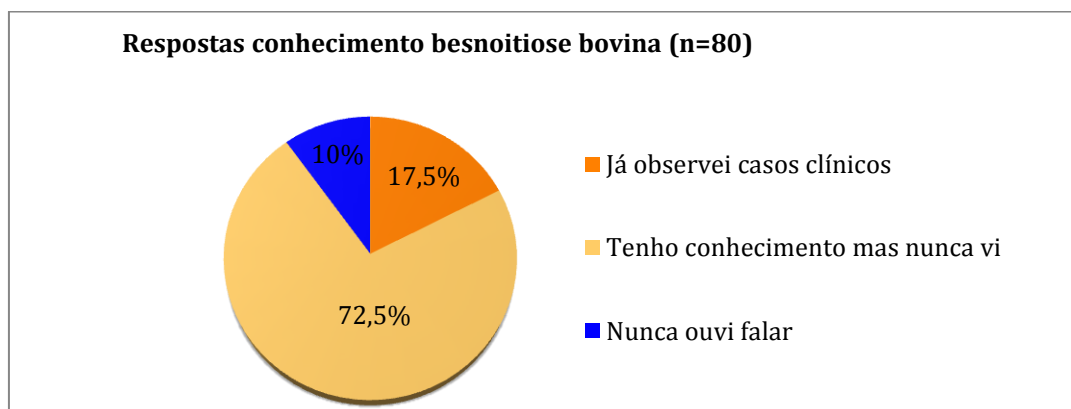


Figura 16. Percentagem de respostas relativamente ao grau de conhecimento da besnoitiose bovina

Os MV com experiência de campo de besnoitiose bovina responderam à parte I do questionário e os restantes à parte II. As respostas foram obtidas de 16 distritos de Portugal continental e da região autónoma dos Açores. Não obtivemos respostas dos distritos de Coimbra e Faro e da região autónoma da Madeira. Não nos foi possível apurar a área de intervenção de 10 dos MV que responderam à parte II do questionário (conhecimento mas nunca viram). No total contabilizámos 5 respostas do distrito de Viana do Castelo, 4 de Bragança, 8 de Braga, 5 do Porto, 5 de Vila Real, 3 de Aveiro, 5 de Viseu, 2 da Guarda, 3 de Castelo Branco, 3 de Leiria, 6 de Santarém, 5 de Lisboa, 2 de Setúbal, 7 de Portalegre, 6 de Évora, 11 de Beja e 2 da região autónoma dos Açores (Figura 17). Os MV que já diagnosticaram a doença indicaram como áreas de intervenção os distritos pertencentes às regiões NUTS 2 Alentejo e Lisboa. Os distritos com um maior número de MV que já viram casos de doença foram Setúbal (2/2 MV; 100%) e Évora (5/6; 83,3%), seguidos de Portalegre (5/7 MV; 71,4%), Beja (5/11; 45,5%), Santarém (2/6; 33,3%) e Lisboa (1/5; 20%). Todas as respostas indicando desconhecimento da doença reportam-se à região Norte do país, com exceção de um dos inquiridos (1/7; 16,7%), de Portalegre. Os distritos com maior número de MV que admitiram nunca ter ouvido falar em besnoitiose bovina foram Viana do Castelo (3/5; 60%) e Bragança (2/4; 50%), seguidos de Aveiro (1/3; 33,3%), Porto (1/5; 20%), Vila

Real (1/5; 20%), Viseu (1/5; 20%), Portalegre (1/7; 14,3%) e Braga (1/8; 12,5%) (Figura 17). Os restantes, incluindo os 2 MV da região autónoma dos Açores, tinham conhecimento da doença, mas nunca viram casos.

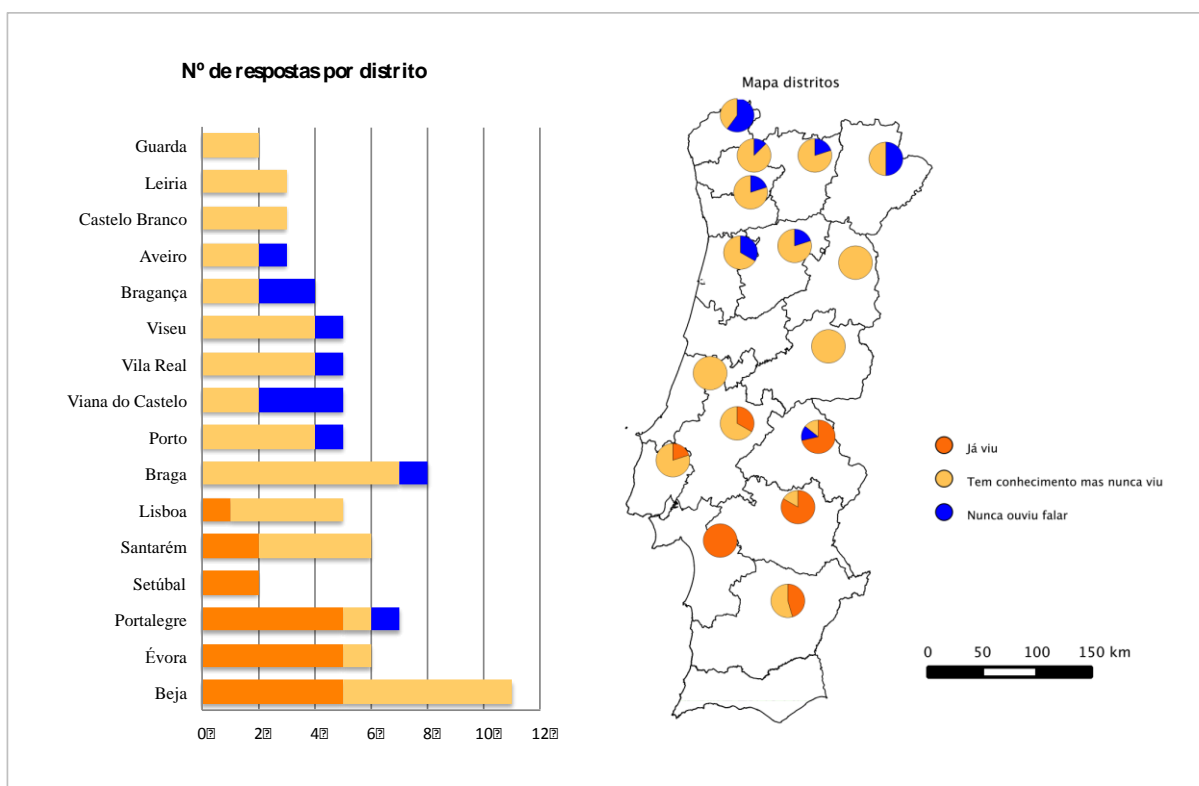


Figura 17. Número e distribuição por distrito das respostas relativas ao grau de conhecimento da besnoitiose bovina em Portugal continental (n=70).

Respostas à parte I do questionário

Em relação ao número médio de explorações observadas por ano, 7 MV (50%) indicaram “2-4”, 5 MV (35,7%) “<1” e 2 MV (14,3%) “>4” explorações. Os casos de besnoitiose foram detetados ao longo de todo o ano, com a seguinte distribuição: 11 dos inquiridos (78,6%) indicaram o trimestre abril-junho, 10 (71,4%) o trimestre julho-setembro, 7 (50%) o trimestre janeiro-março e 7 (50%) o trimestre outubro-dezembro. Os casos observados entre jan-mar foram considerados pouco frequente por todos os inquiridos (7/7). No trimestre abril-junho, 5 dos MV (45,5%) consideraram a frequência da doença baixa, 5 média (45,5%) e um (9,1%) alta. Entre julho-setembro, 8 MV (80%) foram da opinião que a frequência da besnoitiose bovina é média, um (10%) considerou a frequência alta e um (10,0%) considerou a doença pouco frequente. No trimestre outubro-dezembro, 4 (57,1%) dos inquiridos consideraram a frequência da doença baixa, 7 (14,3%) média e os restantes (28,6%) alta (Figura 18).

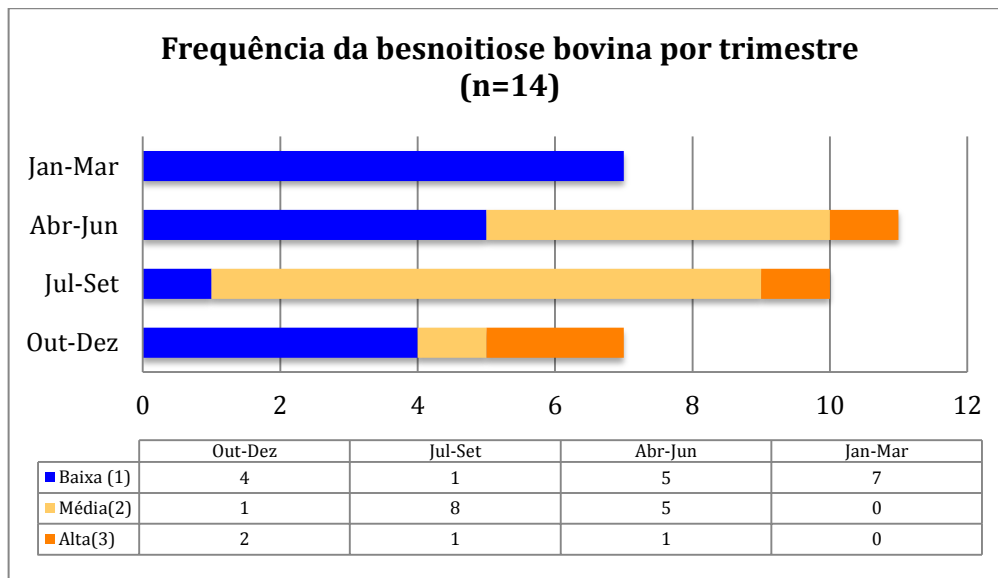


Figura 18. Opinião sobre a frequência da besnoitiose bovina, por trimestre do ano.

Em relação aos sinais clínicos, 6 dos 14 MV (42,9%) já diagnosticaram os animais na fase aguda da doença. Todos os MV que detetaram a besnoitiose bovina na fase aguda observaram anorexia, aumento da frequência cardíaca e respiratória, edemas, orquite, congestão das mucosas, corrimento nasal e locomoção lenta. Os sinais clínicos hipertermia, linfadenopatia e fotofobia foram indicados por 5 (83,3%) MV e 4 MV (66,7%) observaram decúbito prolongado. Quatro MV consideraram os edemas muito frequentes, 4 MV consideraram a frequência da hipertermia média ou alta e 5 MV consideraram a frequência da orquite média ou alta. O decúbito prolongado foi o sinal clínico menos observado (4/4) (Figura 19).

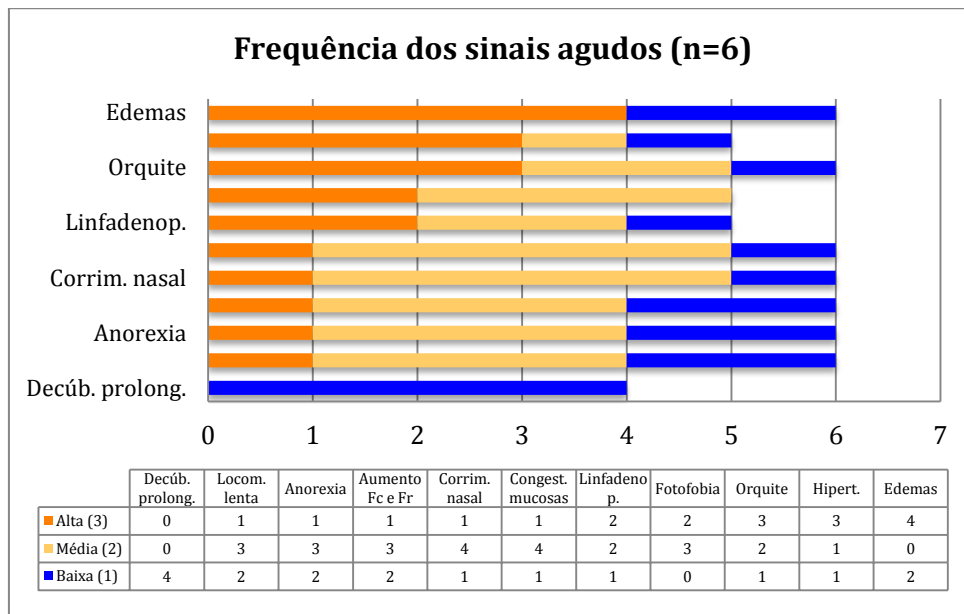


Figura 19. Opinião sobre a frequência dos sinais agudos da besnoitiose bovina.

Relativamente aos sinais crónicos, todos os inquiridos (n=14) indicaram espessamento das pregas da pele, alopecia e hiperqueratose e fissuras entre as pregas de pele, 12 MV (85,7%) referiram anorexia, emaciação e seborreia, 11 MV (78,6%) linfadenopatia superficial e atrofia testicular uni/bilateral, 10 MV (71,4%) hipertermia ligeira, infertilidade nos machos e corrimento nasal mucopurulento e 9 MV (64,3%) quistos na conjuntiva da esclera/ mucosa nasal/vulvar (Figura 20).

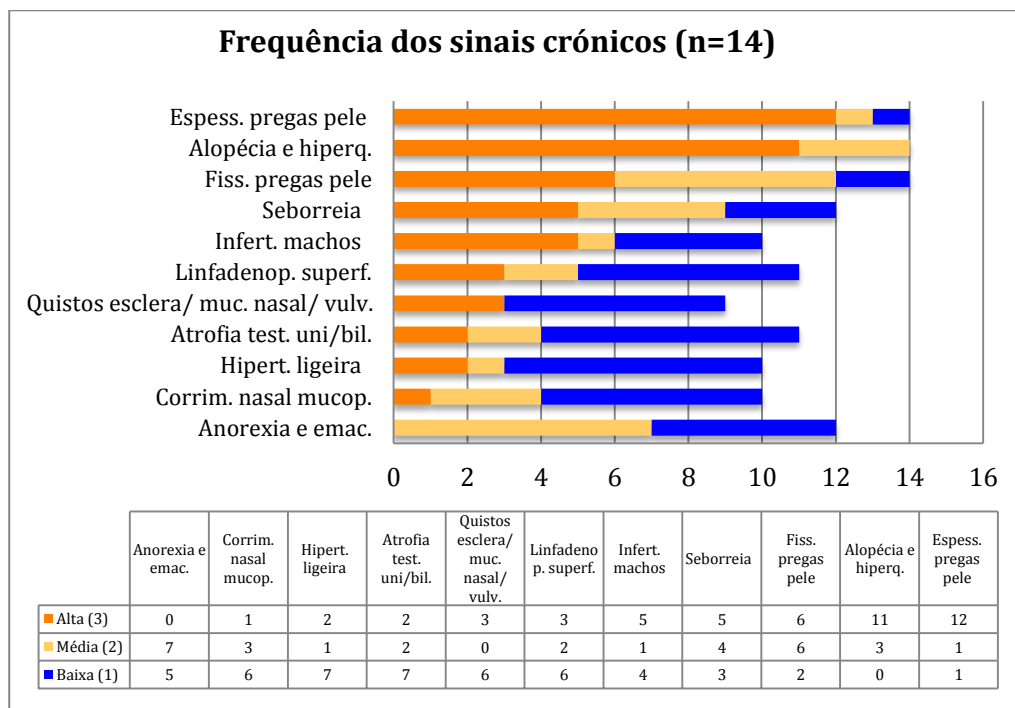


Figura 20. Opinião sobre a frequência dos sinais crónicos da besnoitiose bovina.

Dos sinais clínicos listados, a alopecia, hiperqueratose, espessamento e pregueamento da pele destacaram-se em frequência

No que diz respeito aos métodos de diagnóstico, metade dos MV (7/14) recorreram ao diagnóstico laboratorial e a outra metade baseou-se exclusivamente na observação dos sinais clínicos. Dos MV que utilizaram o diagnóstico laboratorial, um (14,3%) indicou a ELISA, 2 (28,6%) a IFI, mas 4 (57,1%) não se recordavam da técnica utilizada pelo laboratório. 10 MV (71,4%) adotaram medidas preventivas. A medida “refugo dos animais doentes” foi a estratégia de eleição, tendo sido adotada por todos (10/10). Oito MV optaram ainda por separar os animais infectados, 5 reforçaram o tratamento inseticida, 4 adotaram a medida “rastreamento dos animais adquiridos” e outros 4 a medida “refugo dos animais serologicamente positivos”.

Dois inquiridos basearam-se apenas no refugo dos animais doentes enquanto 8 combinaram duas ou mais medidas de prevenção: 3 MV combinaram as cinco opções possíveis no questionário (“refugo dos animais doentes”, “refugo dos animais serologicamente positivos”, “separação dos animais infectados”, “reforço dos tratamentos inseticidas”, “rastreamento serológico dos animais adquiridos”), 2 combinaram as medidas “refugo dos animais doentes” e “separação dos animais infectados”, 1 optou pelo “refugo dos animais doentes”, “separação dos animais infectados, reforço dos tratamentos inseticidas e rastreamento serológico dos animais adquiridos” e 1 implementou as medidas “refugo dos animais doentes”, “refugo dos animais serologicamente positivos” e “separação dos animais infectados” (Figura 21).

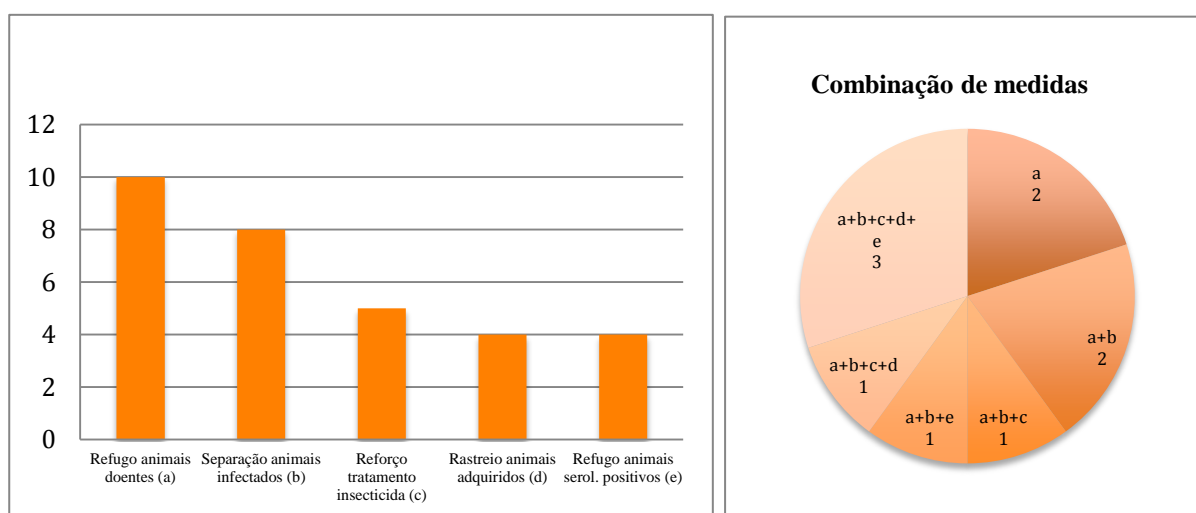


Figura 21. Nº de respostas relativas às medidas e combinações de medidas adotadas pelos MV (n=10) para a prevenção da besnoitiose bovina.

Em relação à observação de casos de besnoitiose no ano de 2013, 8 MV (57,1%) responderam afirmativamente. Os animais foram diagnosticados num total de 22 explorações, distribuídas por 14 concelhos: Portalegre, Ponte de Sôr, Alter do Chão, Santarém, Mora, Monforte, Estremoz, Elvas, Arraiolos, Montemor, Portel, Alandroal, Reguengos de Monsaraz e Crato. Os casos nos concelhos de Reguengos de Monsaraz, Portel e Ponte de Sôr, foram detetados pela primeira vez em 2013, sendo a besnoitiose bovina conhecida nos outros concelhos anteriormente a 2013. Para além dos concelhos referidos, a besnoitiose tinha sido também diagnosticada nos últimos 5 anos nos concelhos de Alcácer do Sal, Alvito, Aviz, Coruche, Cuba, Ferreira, Lisboa, Moura e Odemira (Figura 22).

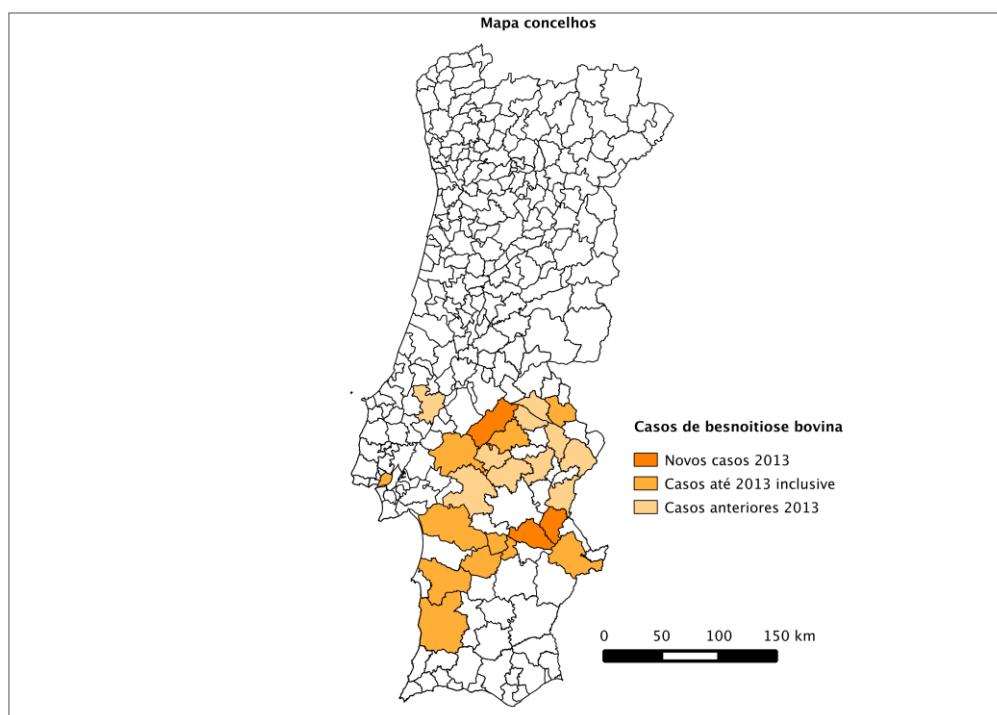


Figura 22. Distribuição geográfica dos casos clínicos de besnoitiose bovina por concelho.

Relativamente às questões sobre o número de animais com manifestações clínicas e o número de mortes nas explorações infetadas em 2013, obtivemos dados sobre 20 explorações. Em 13 destas explorações (65,0%) foram observados 1-2 animais com sinais clínicos, 5 (25%) explorações apresentavam 3-5 animais com sinais clínicos, numa exploração (5%) foram diagnosticados 5-10 animais com sinais clínicos e noutra (5%) mais de 10 animais. No que diz respeito ao número de mortes provocadas pela doença, em 85% das explorações (17/20) não se verificaram casos de morte e nas restantes ocorreram 1-2 casos.

No que respeita a importância económica da doença, medida numa escala de 1-4, 4 MV (28,6%) atribuíram-lhe uma importância baixa, 9 (64,3%) uma importância média ou média alta e um (7,1%) MV considerou a sua importância elevada (Figura 23).

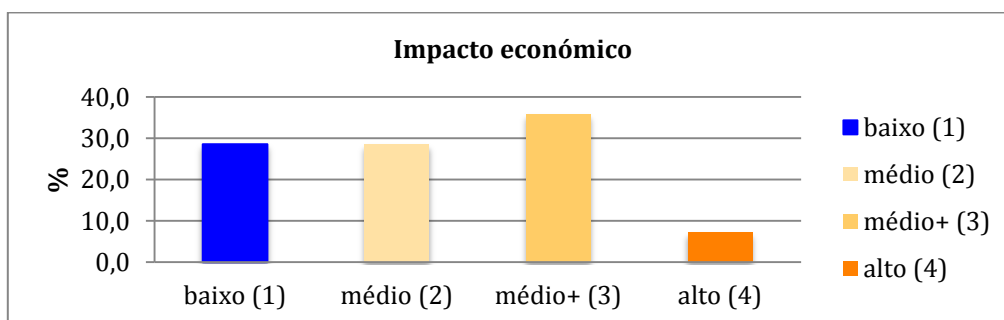


Figura 23. Opinião dos MV (n=14) relativamente à importância económica da besnoitose bovina, medida numa escala de 1-4.

Respostas à parte II do questionário

Depois de consultar a página com a descrição das principais manifestações cutâneas e reprodutivas da besnoitose bovina, 16,7% (11/66) dos MV informados sobre a doença, mas sem experiência de campo e os que desconheciam a doença admitiram poder ter observado sinais clínicos compatíveis com besnoitose bovina nos últimos 5 anos. Quando questionados relativamente à observação de sinais cutâneos e reprodutivos compatíveis com besnoitose bovina, das várias combinações possíveis, 10 MV assinalaram “apenas sinais cutâneos” e um observou “sinais cutâneos e infertilidade nos machos”. Em relação aos MV que observaram sinais cutâneos, 9 referiram “espessamento e pregueamento da pele” e “alopécia” e 8 indicaram hiperqueratose”. Três MV assinalaram “seborreia” e um MV observou “quistos na conjuntiva da esclera ou mucosa nasal/vulvar”. Das doenças contempladas no diagnóstico diferencial das manifestações cutâneas, os inquiridos assinalaram uma ou mais causas. A sarna destacou-se entre as causas possíveis, com 70% das respostas, seguida de carências minerais (20%), agentes tóxicos (10%) e hipersensibilidade (10%). Em 30% dos casos, não foi atribuída uma etiologia (Figura 24).

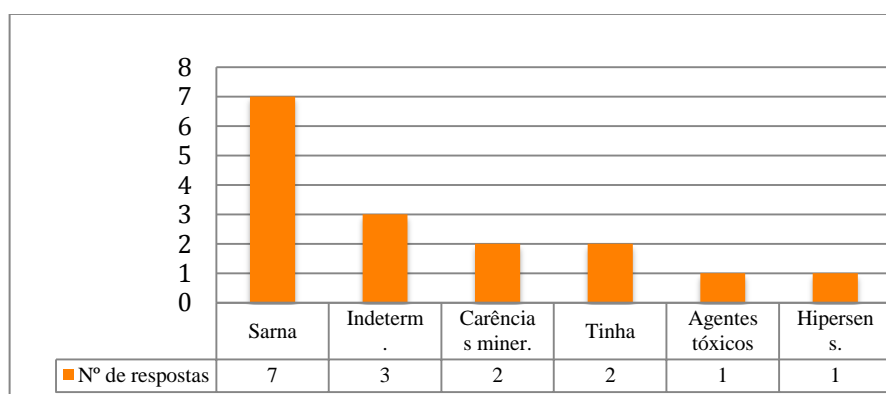


Figura 24. Doenças contempladas no diagnóstico diferencial da besnoitose bovina.

Nas explorações onde estes casos foram observados, 4 MV (40%) consideraram que a besnoitiose bovina poderá ter provocado a morte dos animais. Os sinais clínicos compatíveis com besnoitiose bovina foram observados ao longo de todo o ano. Sete (70%) dos inquiridos indicaram o trimestre julho-setembro, 6 (60%) o trimestre outubro-dezembro, 5 (50%) o trimestre janeiro-março e 4 (40%) o trimestre abril-junho.

A frequência de casos foi considerada maioritariamente baixa, com exceção do trimestre julho-setembro, em que 4 (57,1%) dos MV lhe atribuíram uma frequência média (Figura 25).

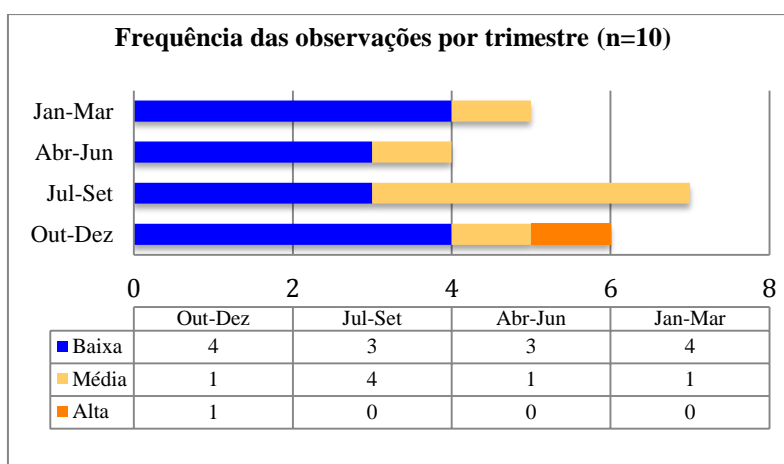


Figura 25. Opinião sobre a frequência de observação dos sinais clínicos compatíveis com besnoitiose bovina, por trimestre.

Quando questionados especificamente em relação ao ano 2013, quatro MV (40%) afirmaram poder ter observado casos de besnoitiose bovina. Os concelhos referidos foram Almodôvar, Benavente, Ponte de Lima, Viseu e Leiria (Figura 26). Três dos MV observaram os casos numa exploração apenas e um observou casos em duas explorações.

O número de animais afetados por exploração foi de 1-2. Quanto aos últimos 5 anos, os concelhos indicados foram Trancoso, Mêda, Almeirim, Almodôvar, Benavente, Serpa, Ponte de Lima, Montalegre, Leiria, Viseu, Castro Verde e Coruche (Figura 26).

O único MV que observou “sinais cutâneos e infertilidade nos machos” observou todas as manifestações cutâneas constantes do questionário.

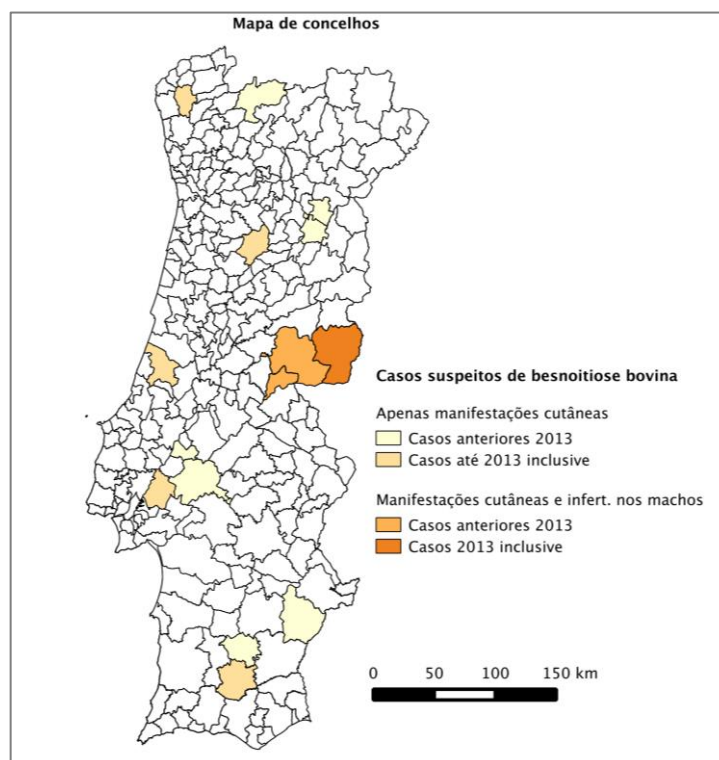


Figura 26. Distribuição geográfica dos concelhos onde foram observados animais com sinais clínicos compatíveis com besnoitiose bovina.

Quanto à frequência dos sinais, considerou a alopecia, a hiperqueratose e os quistos na conjuntiva da esclera/mucosa vulvar/oral “pouco frequente”, o espessamento e pregueamento da pele frequente e a seborreia “muito frequente”. Relativamente ao diagnóstico diferencial das manifestações cutâneas, o MV assinalou “carências minerais” e em comentário acrescentou “pediculose”. Os sinais do aparelho reprodutor observados foram atrofia testicular (frequente) e infertilidade nos machos (pouco frequente). No diagnóstico diferencial das várias hipóteses colocadas no questionário (IBR, BVD, Brucelose, outras) o MV suspeitou de IBR. Em nenhum dos casos, a gravidade das manifestações clínicas resultou na morte dos animais. Os animais com sinais compatíveis com besnoitiose bovina foram observados pelo MV ao longo de todo o ano, sendo pouco frequentes nos trimestres de janeiro-março e abril-junho e frequentes em julho-setembro e outubro-novembro. Em 2013, estas observações foram feitas num total de 5 explorações, nos concelhos de Vila Velha de Ródão, Idanha-a-Nova e Castelo Branco. Em duas das explorações foram observados 1-2 animais com sinais clínicos e numa exploração 3-5 animais, não havendo dados relativamente às restantes duas explorações. Quanto aos últimos 5 anos, o MV indicou o concelho de Idanha-a-Nova.

4. Discussão

Com este questionário pretendemos colher informações junto dos MV de campo relativamente à prevalência e à extensão geográfica dos casos clínicos de besnoitiose bovina em Portugal e avaliar o grau de alerta para a doença.

O número de respostas obtido permitiu uma boa cobertura geográfica de Portugal continental, com 16 distritos representados. A percentagem de MV com experiência clínica de besnoitiose bovina foi baixa (17,5%). Este resultado era esperado, uma vez que o rastreio serológico revelou uma prevalência relativamente baixa da infeção a nível nacional, com uma concentração geográfica das explorações seropositivas na região do Alentejo. Coincidindo com estes dados, os MV com experiência clínica da doença indicaram como áreas de intervenção os distritos Santarém, Lisboa, Setúbal, Évora, Beja e Portalegre. Com exceção do concelho de Odemira, todos os concelhos com casos de besnoitiose bovina indicados fazem parte do *cluster* identificado no estudo anterior ou são inter-seccionados pelo seu perímetro. O baixo número de MV com experiência de campo também pode ser explicado pela baixa morbidade (1-10%) da infeção e por que na maior parte das vezes, os casos clínicos se manifestam quando a seroprevalência na exploração já é elevada (Berhault, 2008). No rastreio serológico verificámos que cerca de metade das explorações positivas apresentava prevalências $\leq 10,3\%$. A baixa morbidade da doença constatou-se também nas respostas ao questionário, em que 35% dos MV afirmou observar em média < 1 exploração por ano e 50% observaram 2-4 explorações por ano. Em 2013, 8 dos MV diagnosticaram a doença num total de 22 explorações, em 14 concelhos no Alentejo. Na maioria das explorações (65%; n=20) registaram-se 1-2 casos clínicos, 25% apresentavam 3-5 animais doentes e as restantes mais de 5 casos. Quanto ao número de mortes, apenas 1-2 casos foram associados a *B. besnoiti* em três das explorações, o que está igualmente de acordo com a baixa mortalidade ($\leq 10\%$) referida na literatura (Pols, 1960). Relativamente à sazonalidade da doença, os casos de besnoitiose bovina foram diagnosticados ao longo de todo o ano, com maior destaque para os trimestres abril-junho (78,6%) e julho-setembro (71,4%), comparativamente aos trimestres outubro-dezembro e janeiro-março (50%). Embora a incidência de casos clínicos seja habitualmente associada aos meses do verão, os animais que se infetam no final desta estação poderão ser apenas detetados nos meses do outono ou mesmo no inverno, devido ao período de tempo necessário para o aparecimento dos sinais crónicos característicos e à falta de alerta dos proprietários para esta doença. Por outro lado, em consequência das alterações climáticas em Portugal desde meados dos anos 1970, tem-se vindo a notar um aumento do número de “dias de verão” e de “noites tropicais”, o que poderá contribuir para um prolongamento do

período de atividade dos artrópodes hematófagos e assim da transmissão do parasita. Os sinais agudos, difíceis de detetar devido à sua inespecificidade, foram diagnosticados por 42,9% dos MV, o que mostra que uma parte dos MV está bem familiarizada com a doença. Na fase crónica, os sinais clínicos mais evidentes foram “espessamento das pregas da pele”, “alopécia”, “hiperqueratose” e “fissuras entre as pregas de pele”, observados por todos os MV. Relativamente aos métodos de diagnóstico, metade dos clínicos dispensou o diagnóstico laboratorial. Quanto às medidas preventivas, adotadas pela maioria dos MV (71,4%), concluímos que a medida “refugo dos animais doentes” é considerada a estratégia mais eficaz no combate à doença, uma vez que foi implementada por todos, isoladamente ou em combinação com outras medidas. Mais de dois terços dos MV atribuíram uma importância económica média, média alta ou alta à doença e apenas 28,6% consideraram que o impacto económico da doença é baixo.

Relativamente aos MV sem experiência clínica da doença, constatou-se que 12,5% nunca tinham ouvido falar em besnoitiose bovina. As áreas de intervenção dos MV que desconheciam a doença localizam-se quase exclusivamente na região Norte do país, onde até ao presente nunca houve história de casos de besnoitiose bovina. Depois de consultar a página com a descrição das principais manifestações clínicas, 16,7% dos MV sem experiência de campo admitiram a possibilidade de ter observado sinais clínicos compatíveis com besnoitiose bovina nos últimos 5 anos. De facto, no rastreio serológico detetámos animais com serologia positiva em 6 dos 15 concelhos indicados pelos inquiridos (Montalegre, Trancoso, Idanha-a-Nova, Castelo Branco, Coruche e Benavente). Os primeiros casos clínicos a norte do rio Tejo, em Idanha-a-Nova e Castelo Branco, foram confirmados serologicamente e por histopatologia em 2014, pouco tempo depois do questionário.

No geral, o questionário revelou que a experiência clínica e o conhecimento da besnoitiose bovina é geograficamente limitado, acompanhando a aparente concentração dos casos clínicos na região do Alentejo e que ainda existe um número significativo de MV que desconhece a doença. Uma vez que o estudo serológico e os primeiros casos de besnoitiose bovina na região Centro mostraram que a infeção não está confinada ao Alentejo, estes resultados sublinham a necessidade de divulgar o quadro clínico e os métodos de diagnóstico, incluindo os recursos laboratoriais disponíveis, como forma de sensibilizar e alertar os médicos veterinários e produtores pecuários e assim promover a detecção precoce e combater a disseminação da doença.

Capítulo VI - Rastreamento serológico da infecção por *B. besnoiti* em espécies domésticas e silváticas

1. Introdução

Os estudos serológicos são amplamente utilizados para estudar a presença e a distribuição de doenças infecciosas nas populações de animais silváticos. No caso dos agentes cujo ciclo de vida é desconhecido, a detecção de uma seroprevalência elevada numa dada espécie poderá indicar um bom candidato a HD ou HI. Pelo contrário, a seroprevalência baixa ou não detecção de anticorpos poderá excluir ou relativizar a importância da espécie no ciclo. Dos estudos de infecção experimental realizados com *B. besnoiti*, sabe-se que este parasita tem a capacidade de infetar várias espécies animais para além dos bovinos, sobretudo pequenos ruminantes, mas também leporídeos e roedores. Por esta razão, o rastreamento de *B. besnoiti* nas várias espécies domésticas e silváticas, em especial aquelas cuja área de distribuição coincide com a área do *cluster* de besnoitiose identificado na região do Alentejo central e norte e no sul da região de Lisboa e Vale do Tejo, poderá ser extremamente útil para identificar os candidatos mais prováveis a HD e/ou HI.

Uma das grandes limitações ao estudo serológico das espécies silváticas é a falta de testes de diagnóstico adaptados às espécies em estudo, uma vez que não são comercializados anticorpos secundários para a maioria das espécies silváticas. A técnica de B-MAT é uma boa solução para o diagnóstico, uma vez que dispensa o uso de anticorpos secundários antiespécie, podendo ser utilizada para detectar anticorpos específicos em qualquer espécie animal. As técnicas de aglutinação direta têm sido largamente utilizadas no estudo da infecção por parasitas filogeneticamente próximos de *B. besnoiti*, em especial *T. gondii*, *N. caninum* e *Sarcocystis neurona*, tanto em espécies domésticas, como silváticas. A sensibilidade e a especificidade do teste de aglutinação direta no diagnóstico da infecção por *T. gondii* foram determinadas em porcos (Se 83% e Sp 90%) (Dubey *et al.*, 1995), ovinos (Se 96% e Sp 89%) (Shaapan *et al.*, 2008), no gato (Se 98% e Sp 100%) (Macrì, Sala, Linder, Pettirossi & Scarpulla, 2009) e no ser humano (Se 96% e Sp 99%) (ToxoScreen DA, bioMérieux). No caso de *N. caninum*, o teste de aglutinação direta revelou uma Se de 100% e uma Sp de 97% (Packham *et al.*, 1998) e para *Sarcocystis neurona* observou-se uma Se de 100% e uma Sp de 90% no ratinho (Lindsay & Dubey, 2001). Apesar de a matriz de eleição para a pesquisa de anticorpos ser o soro, a colheita de sangue de animais silváticos é difícil, sendo os soros, na maior parte das vezes, obtidos de espécies cinegéticas, durante as épocas de caça. Isto traz várias limitações, nomeadamente no que diz respeito às espécies disponíveis para o estudo, à

altura do ano, à idade e à distribuição geográfica dos animais. A colheita de sangue de espécies não cinegéticas exige a imobilização ou eutanásia dos animais, sendo apenas possível em situações excepcionais, como no caso de animais capturados nos parques naturais, para fins de tratamentos ou estudos específicos. Uma alternativa à colheita de sangue dos animais vivos, é a preparação de extratos de tecidos colhidos das carcaças dos animais, para análise serológica. A recolha de cadáveres de espécies silváticas resultante de atropelamentos, doença ou outros é efetuada pelas entidades do Ministério da Agricultura e do Mar ou pelos serviços municipais. Os animais mortos são frequentemente disponibilizados para estudos diversos, podendo ser congelados até à sua utilização. Apesar de os estudos serológicos realizados *post-mortem* serem relativamente escassos, esta metodologia já foi aplicada com bons resultados na pesquisa de anticorpos anti-*T.gondii* em extratos de tecido pulmonar colhido de cadáveres de animais silváticos.

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo rastrear a infeção por *B. besnoiti* em espécies domésticas e silváticas, com destaque para os animais provenientes da região do Alentejo, utilizando a técnica de B-MAT.

2. Material e métodos

Origem do material biológico testado

Neste estudo analisámos soros de espécies silváticas provenientes da Tapada de Mafra, soros de porcos do banco de soros do INIAV, provenientes de explorações, sobretudo de regime extensivo, da região do Alentejo, Lisboa e Centro, bem como soros e fragmentos de pulmão colhido de cadáveres enviados para o INIAV no âmbito do projeto LIFE (Promoção do Habitat do Lince-ibérico e do Abutre-preto no Sudeste de Portugal), implementado nas regiões de Mourão, Moura e Barrancos, do Vale do Guadiana e da Serra do Caldeirão, nas áreas da Rede Natura 2000 aí existentes. A utilização das amostras do projeto LIFE para efeitos do presente estudo foi autorizado pela DGAV. Não foram colhidas amostras de pulmão dos animais com sinais de decomposição avançada .

Análise serológica

A pesquisa de anticorpos anti-*Besnoitia* spp. foi efetuada pela técnica de B-MAT, em soros e extratos pulmonares. Todos os soros/extratos pulmonares com reação duvidosa no B-MAT foram confirmados por IFI.

O antigénio para o B-MAT e para a preparação das lâminas de imunofluorescência foi produzido conforme descrito no capítulo I. Os procedimentos para a execução da prova foram

idênticos aos descritos para o rastreio de *B. besnoiti* em bovinos nos capítulos I e II, com exceção da diluição *cut-off* utilizada, que foi de 1:80. Com a escolha de um *cut-off* mais baixo pretendeu-se aumentar a sensibilidade do rastreio, uma vez que o B-MAT não está validado para outras espécies e se desconhece o seu comportamento quando utilizado na pesquisa de anticorpos em extratos pulmonares, onde se prevê uma maior diluição dos anticorpos.

Uma vez que neste estudo muitos dos animais já se encontravam congelados havia cerca de um ano, testámos em paralelo extratos pulmonares de felídeos para *T. gondii* através da prova de aglutinação direta (DA) para avaliar o desempenho da técnica na deteção de anticorpos específicos nesta matriz. O fundamento para o despiste da infeção por *T. gondii* pela prova de DA foi o facto de se tratar de um parasita filogeneticamente próximo de *B. besnoiti*, de a prova serológica se basear no mesmo princípio do B-MAT e de haver evidência na literatura sobre a utilização desta prova no despiste de anticorpos anti-*T. gondii* em extratos pulmonares de espécies silváticas. As análises para despiste de anticorpos anti-*T. gondii* foram efetuadas com o kit ToxoScreen DA (bioMérieux), de acordo com as instruções do fabricante e incluindo um controlo positivo e um controlo negativo de gato. A diluição *cut-off* utilizada foi 1:40.

Preparação de extratos pulmonares

Os extratos pulmonares foram preparados de acordo com as metodologias descritas por Ferroglio, Rossi & Gennero (2000). Durante a necrópsia colheu-se uma amostra de tecido pulmonar com aproximadamente 5-10 g de cada animal. Para a preparação dos extratos, retirou-se de cada uma das amostras uma porção com cerca de 2,5 g. Os fragmentos foram lavados em PBS e o excesso de líquido foi removido com papel absorvente. As amostras foram cortadas em pequenos pedaços e transferidas para um tubo Falcon de 15 ml contendo 2 ml PBS, pH 7,2. Após 20 min à temperatura ambiente, os tubos foram agitados durante 4 min e centrifugados a 800 g, durante 10 min. De cada um dos tubos colheu-se 1,5 ml de extrato pulmonar para um tubo Eppendorf. Os extratos foram centrifugados a 3500 rpm, durante 3 min para remover os detritos. Os sobrenadantes foram colhidos para novos tubos Eppendorf e congelados a -20°C até à sua utilização.

3. Resultados

Espécies e número de animais testados

No curso de 2013-2014 rastreámos 1297 animais para *Besnoitia besnoiti*. No total foram analisadas 10 espécies de animais carnívoros (Tabela 14) e 7 espécies de animais

herbívoros ou omnívoros (Tabela 15). Relativamente às matrizes utilizadas para a prova serológica, testámos 1241 soros e 56 extratos pulmonares.

As espécies carnívoras incluíram 310 cães e 89 gatos errantes, 26 raposas, 7 gatos bravos, 2 lontras, 7 fuinhas, 8 texugos, 3 toirões, 18 genetas e 37 sacarrabos.

Tabela 15. Espécies animais carnívoras testadas para despiste da infeção por *Besnoitia* spp.

Família	Nome comum	Espécie	Matriz (n)	
			Soro	Extrato pulmonar
Canidae	Cão	<i>Canis familiaris</i>	310	0
	Raposa	<i>Vulpes vulpes</i>	19	7
Felidae	Gato doméstico	<i>Felis catus</i>	73	16
	Gato bravo	<i>Felis silvestris</i>	4	3
Mustelidae	Lontra	<i>Lutra lutra</i>	0	2
	Fuinha	<i>Martes foina</i>	5	2
	Texugo	<i>Meles meles</i>	0	8
	Toirão	<i>Mustela putorius</i>	1	2
Viverridae	Geneta	<i>Genetta genetta</i>	14	4
Herpestidae	Sacarrabos	<i>Herpestes ichneumon</i>	31	6

O despiste de *T. gondii* foi efetuado no tecido pulmonar colhido de 17 felídeos, entre os quais 15 gatos domésticos (*Felis catus*) errantes e 2 gatos selvagens (*Felis silvestres*). Quanto às espécies não-carnívoras, testámos 83 javalis, 528 porcos, 1 leirão, 1 ratazana, 1 rato do campo, 3 ratos da horta, 26 veados e 111 gamos.

Tabela 16. Espécies animais herbívoras e omnívoras testadas para despiste da infeção por *B. besnoiti*.

Família	Nome comum	Espécie	Matriz	
			Soro	Extrato pulmonar
Suidae	Javali	<i>Sus scrofa</i>	83	0
	Porco	<i>Sus domesticus</i>	528	0
Gliridae	Leirão	<i>Eliomys quercinus</i>	0	1
Muridae	Ratazana	<i>Rattus norvegicus</i>	0	1
	Rato Campo	<i>Apodermus silvaticus</i>	0	1
	Rato da Horta	<i>Mus spretus</i>	0	3
Cervidae	Veado	<i>Cervus elaphus</i>	26	0
	Gamo	<i>Dama dama</i>	111	0

Relativamente à origem geográfica dos animais, as amostras de carnívoros foram obtidas nas regiões NUTS 2 Algarve e Alentejo, num total de 12 concelhos (Tabela 16 e Figura 27) .

Tabela 17. Origem geográfica dos soros de animais carnívoros testados para *B. besnoiti*.

Concelho	Cão	Fuinha	Gato		Geneta	Lontra	Raposa	Sacarr.	Texugo	Toirão
			bravo	Gato						
Almodôvar	---	---	---	3	3	---	---	5	---	1
Barrancos	10	---	1	---	6	---	2	4	2	---
Beja	---	---	---	1	---	---	---	---	---	---
Loulé	39	3	---	16	2	---	1	2	---	---
Mértola	90	1	4	13	4	1	1	1	---	1
Moura	98	2	2	32	1	---	21	20	5	---
Mourão	---	---	---	9	---	---	1	---	---	---
Ourique	---	1	---	---	---	---	---	---	---	---
S. Brás Alportel	35	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Serpa	13	---	---	4	---	1	---	---	1	1
Silves	10	---	---	11	1	---	---	5	---	---
Tavira	15	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Os soros dos herbívoros silvestres foram colhidos nas regiões NUTS 2 Algarve, Alentejo e Lisboa, num total de 7 concelhos (Tabela 17 e Figura 27). Os soros dos porcos foram obtidos dos concelhos de Arronches (n=2), Avis (n=46), Curuche (n=149), Évora (n=52), Montemor-o-Novo (n=149), Odemira (n=71), Santiago do Cacém (n=19), Setúbal (n=2), Tomar (n=9) e Caldas da Rainha (n=29) (Figura 27).

Tabela 9. Origem geográfica dos soros de animais herbívoros testados para *B. besnoiti*.

	Coelho	Javali	Leirão	Ratazana	Rato horta	Rato campo	Gamo	Veado	Tot.
Alcoutim	---	1	---	---	---	---	---	1	2
Loulé	---	10	---	---	---	---	---	---	10
Mértola	21	---	1	---	---	1	---	---	23
Moura	12	3	---	---	2	---	---	14	31
Serpa	3	15	---	---	---	---	---	---	18
Silves	---	2	---	1	1	---	---	---	4
Mafra	---	52	---	---	---	---	111	---	---
Tot.	36	31	1	1	3	1	---	15	88

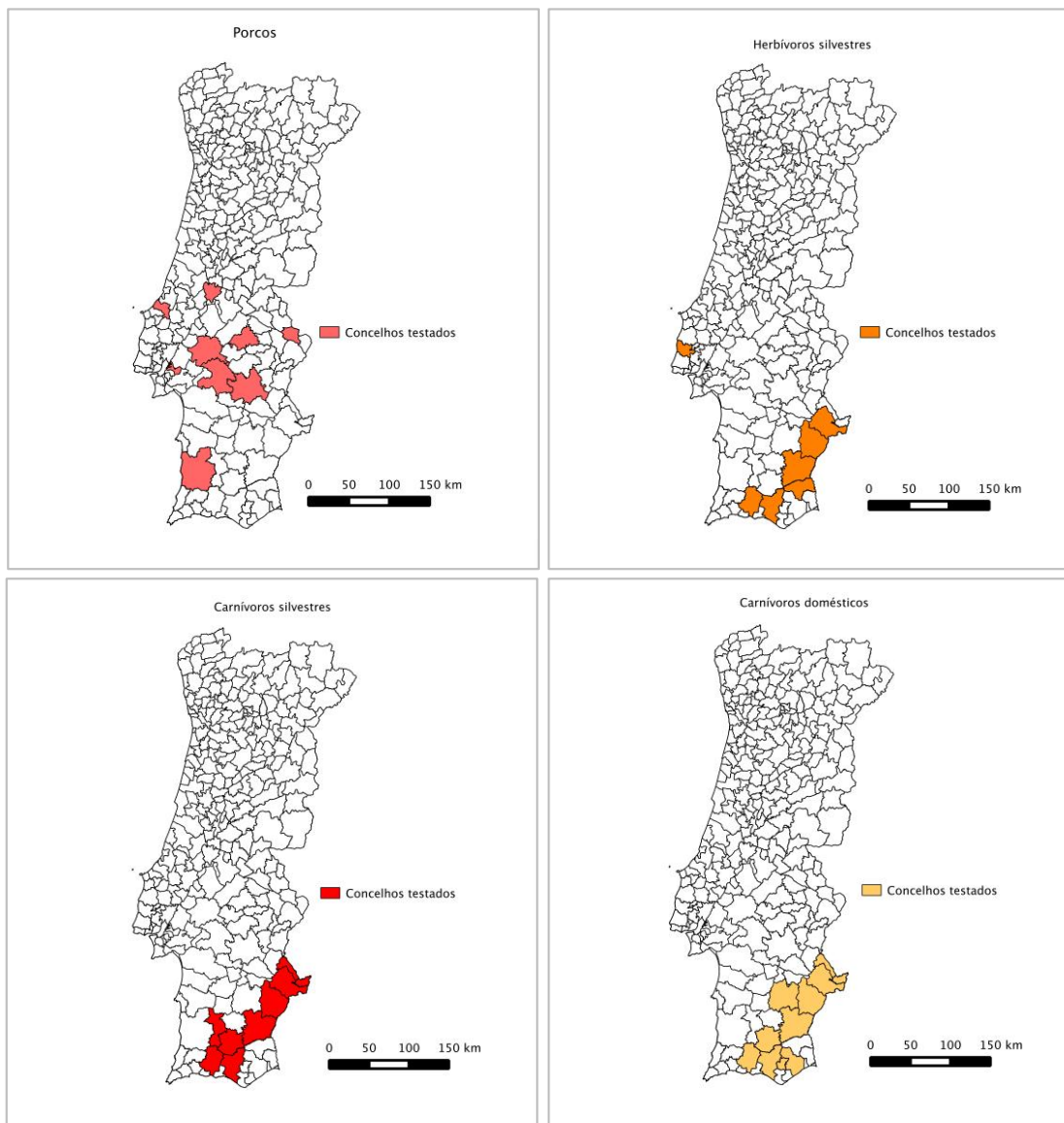


Figura 27. Mapa dos concelhos de origem dos soros dos porcos, herbívoros silvestres e carnívoros domésticos e silvestres testados para *B. besnoiti*.

Resultados serológico

Não foram detetados anticorpos específicos anti-*B. besnoiti* em nenhum dos animais testados, quer nos soros, quer nos extratos pulmonares. Relativamente aos extratos de pulmão dos felídeos analisados para *T. gondii*, 10 dos 17 animais eram positivos. A titulação seriada resultou nos seguintes títulos: 180 (2 gatos domésticos), 540 (1 gato doméstico), 1620 (1 gato doméstico e 1 gato bravo), 4000 (1 gato doméstico e 1 gato bravo), 6000 (1 gato doméstico), 18000 (1 gato doméstico), 162000 (1 gato doméstico).

4. Discussão

Este trabalho teve como objetivo fazer um rastreio serológico de diversas espécies silváticas e domésticas para pesquisa de anticorpos anti-*B. besnoiti*. Para tal, foram utilizadas amostras provenientes sobretudo de áreas geográficas onde este parasita ocorre. Neste estudo, para além de amostras de soro, utilizámos também extratos de tecido pulmonar, preparadas a partir de fragmentos de pulmão colhidos de cadáveres de animais congelados.

Esta metodologia já tinha sido descrita anteriormente. Gorin, Stewart & Gould (1979) demonstraram a presença de imunoglobulinas (IgG, IgA e IgM) em extratos pulmonares (EP) de ovelhas. Waller, Lyngset, Elvander & Morein (1980) analisaram extratos de baço, fígado, rins e pulmão e concluíram que a deteção de IgG nos EP era mais fiável. Os EP foram utilizados com sucesso no diagnóstico de diversos agentes patogénicos, incluindo *Encephalitozoon* em coelhos (Waller *et al.*, 1980), *Francisella tularensis* em aves de rapina (*Accipiter gentilis*) e castores (*Castor fiber*) (Mörner, Sandström & Mattsson 1988), *Brucella* spp. em bovinos e camurças dos pirinéus (Ferroglio *et al.*, 2000), CDV (*Canine Distemper Virus*) e parvovírus canino em carnívoros silváticos (Santos, Almendra & Tavares, 2009; Duarte, Fernandes, Santos & Tavares, 2012) e *T. gondii* em raposas (Jakubek, Mattsson, Mörner, Mattsson & Gavier-Widén, 2012). As vantagens da utilização de EP em alternativa ao soro são óbvias, uma vez que permitem a análise de animais encontrados mortos, as colheitas são simples e os animais ou os órgãos podem ser congelados para análise posterior. No entanto, apesar de a deteção dos anticorpos ser possível nos cadáveres do animais que permaneceram alguns dias à temperatura ambiente, os títulos de anticorpos caem com a decomposição dos animais, sendo este efeito mais marcado ao fim da primeira semana (Waller *et al.*, 1980). Para evitar esta quebra no título de anticorpos, neste estudo utilizámos apenas animais que não apresentavam sinais de decomposição avançada. Por outro lado, estudos prévios mostraram que os títulos de anticorpos nos extratos pulmonares são 1-3 vezes inferiores aos títulos detetados no soro (Waller *et al.*, 1980; Mörner *et al.*, 1988). Admitindo que a sensibilidade do rastreio pudesse ser afetada, optámos por avaliar o desempenho da técnica por comparação com a pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* em 17 EP de felídeos. Os resultados obtidos mostraram, não só uma elevada proporção de animais positivos (10/17), como também uma distribuição de títulos muito semelhante à observada no soro de gatos noutros estudos de seroprevalência. Ficou assim demonstrado, que os EP se encontravam em boas condições para a pesquisa de anticorpos anti-*B. besnoiti*. No entanto, a presença de anticorpos contra *B. besnoiti* não foi detetada em qualquer uma das amostras testadas, quer nos soros, quer nos extratos pulmonares. Estes resultados são semelhantes aos dados obtidos

nos rastreios serológicos realizados em carnívoros e herbívoros silváticos em Espanha, em que todos os carnívoros testados foram negativos e apenas dois ruminantes silváticos apresentavam serologia positiva (Millán *et al.*, 2012; Gutiérrez-Expósito *et al.*, 2013). Todavia, uma vez que a prevalência da besnoitiose bovina é relativamente baixa, reconhecemos que o número de animais analisados por espécie neste estudo é baixo e não permite excluir a infeção por *B. besnoiti* em qualquer uma das espécies estudadas. Assim, a procura dos hospedeiros de *B. besnoiti* requer amostras mais representativas, envolvendo um maior leque de potenciais hospedeiros, entre eles os carnívoros terrestres, aves de rapina, aves migratórias, espécies herbívoras/omnívoras, com destaque para os micromamíferos e também répteis. Idealmente, a colheita das amostras deverá processar-se na área das explorações positivas, em especial aquelas com prevalências mais elevadas.

Capítulo VII - Considerações finais

A besnoitiose bovina é uma doença associada a perdas produtivas consideráveis, para a qual não existe tratamento e não estão disponíveis vacinas seguras e eficazes. O desconhecimento da sua epidemiologia, particularmente no que diz respeito aos mecanismos de transmissão e fatores de risco, inviabilizam a implementação de estratégias de prevenção e controlo eficientes, baseadas em ajustamentos do manejo dos animais, e o refugo ou a segregação dos animais doentes continuam a ser os únicos métodos de controlo conhecidos. A expansão e aumento de incidência da besnoitiose ao longo das duas últimas décadas têm vindo assim a ser um alvo de preocupação crescente na Europa.

Com este trabalho pretendeu-se contribuir para o conhecimento da epidemiologia da besnoitiose bovina, através 1) de uma revisão exaustiva dos estudos relativos à transmissão e ciclo de vida do parasita, 2) do desenvolvimento de técnicas de diagnóstico adaptadas ao rastreio da infeção em bovinos e outras espécies animais, 3) da determinação da prevalência e distribuição geográfica de *B. besnoiti* em Portugal e de um inquérito epidemiológico nas explorações seropositivas, fora da zona de *cluster* histórico da doença, 4) da implementação de um questionário aos médicos veterinários de campo e 5) do rastreio serológico da infeção em potenciais hospedeiros silváticos e domésticos do parasita.

O primeiro trabalho foi dedicado à revisão sistemática dos estudos relativos ao ciclo de vida do parasita. Dos 26 trabalhos analisados concluiu-se que não existe evidência de transmissão direta do parasita, em especial no que diz respeito às vias transplacentária e sexual. À semelhança de outras coccídeas formadoras de quistos, presume-se o envolvimento de um ciclo de vida do tipo predador-presa e a existência de um HD definitivo. Os estudos de infeção experimental em outras espécies mostraram que os taquizoítos e bradizoítos de *B. besnoiti* são infetantes por via parentérica em várias espécies de ruminantes, lagomorfos e roedores. A infeção oral com taquizoítos e intranasal com bradizoítos foi confirmada nos bovinos. A infeção oral com bradizoítos foi confirmada no gato, através da seroconversão. A suscetibilidade à infeção diverge entre as diferentes espécies, variando desde subclínica, a grave e fatal. Para além dos bovinos, as espécies mais sensíveis são os pequenos ruminantes, os coelhos e os gerbilos. Os trabalhos realizados por Bigalke (1968) demonstraram a possibilidade de transmissão mecânica através de artrópodes hematófagos. As observações feitas indicam que a transmissão ocorre sazonalmente e a curtas distâncias, sendo as formas subclínicas as mais frequentes na natureza. Nos rastreios serológicos realizados em diferentes espécies animais domésticas e silváticas, a exposição natural a espécies do género *Besnoitia* foi apenas demonstrada em cervídeos, numa região endémica para *B. besnoiti*. O estudo da

infecção em aves e répteis não foi explorado. A análise crítica dos trabalhos publicados identificou várias falhas relacionadas com a representatividade da amostra, o controlo dos ensaios, o inóculo, as características intrínsecas das espécies analisadas, a origem geográfica dos animais rastreados e os métodos de diagnóstico utilizados.

No âmbito do segundo estudo, desenvolveu-se uma técnica serológica de aglutinação direta (B-MAT), para detecção de anticorpos anti-*B. besnoiti* no soro, baseada nas provas descritas para *T. gondii* e *N. caninum*. O desempenho do B-MAT no diagnóstico serológico da besnoitiose bovina foi avaliado por comparação com a IFI. Para otimizar as condições do protocolo utilizámos soros de bovinos cujo estado de infecção para *B. besnoiti* era conhecido. Os soros positivos foram obtidos de animais com quistos na pele e serologicamente positivos por IFI e os soros negativos de animais de áreas não endémicas para a besnoitiose bovina e reação negativa na IFI. A partir daqui, avaliou-se a sensibilidade e especificidade do B-MAT em relação à IFI com um painel de soros de campo obtido de explorações com besnoitiose bovina em Portugal, Espanha e França. O melhor desempenho da prova foi obtido no *cut-off* 1:160, com uma concordância quase perfeita com a IFI ($\kappa=0,968$) e uma sensibilidade e especificidade relativas de 97,2% e 99,3%, respetivamente. O B-MAT mostrou assim ser uma técnica serológica fiável para o diagnóstico da besnoitiose bovina. A fácil execução e baixo custo tornam esta prova particularmente adaptada aos estudos serológicos em grande escala.

O estudo transversal descritivo da besnoitiose bovina em Portugal continental contou com a colaboração da DGAV e com a participação de todos os laboratórios regionais envolvidos no plano oficial de controlo e erradicação da brucelose bovina. No total foram testados 11477 animais de 391 explorações, em 220 freguesias e 83 concelhos. O diagnóstico serológico baseou-se numa estratégia de testes em série, utilizando o B-MAT no rastreio e a IFI para confirmação, o que permitiu maximizar a especificidade do rastreio, assegurando a verdadeira detecção da infecção numa maior proporção de animais positivos nos testes. Os dados de prevalência resultantes do rastreio foram estimados com um modelo bayesiano. Os resultados desta análise indicam que a infecção por *B. besnoiti* tem uma verdadeira prevalência entre-explorações de 5,1% (Intervalo de credibilidade: 3,1%-7,8%) e uma verdadeira prevalência intraexplorações de 33,0% (Intervalo de credibilidade: 20,3%-46,0%). A estatística de varrimento espacial, presentemente considerado uma das ferramentas estatísticas mais potentes para identificar *clusters* de doença (Costa & Kulldorff, 2009), foi aplicada à distribuição espacial das explorações positivas e negativas detetadas no rastreio e gerou um *cluster* significativo, cobrindo grande parte do Norte e Centro-Alentejo. Este achado está de acordo com a evidência serológica e clínica da doença em Portugal anteriormente obtida. No rastreio foram também identificadas explorações positivas no nordeste do país, na região

Centro e na região Lisboa, tratando-se da primeira evidência serológica da infeção por *B. besnoiti* em bovinos fora da região do Alentejo. Teve-se o cuidado de visitar todas as explorações serologicamente positivas fora da região do Alentejo, não tendo sido observados sinais clínicos compatíveis com besnoitiose nos animais dessas manadas. Em 6 das oito explorações visitadas foram referidas importações de animais do Alentejo e em 4 ainda se encontravam animais provenientes desta região. Relativamente aos inquéritos epidemiológicos realizados nestas explorações, embora o número de explorações visitadas não permita estabelecer associações estatisticamente significativas, as características de manejo produtivo e reprodutivo e de habitat observadas, sugerem um padrão comum. Assim, a permanência prolongada nas pastagens, a proximidade física dos animais nas pequenas explorações ou em lotes, nas grandes explorações, a sobreposição com os habitats de animais silváticos e a exposição continuada a artrópodes hematófagos aparentam ser fatores predisponentes para a infeção.

Uma vez que o quadro clínico da doença pode ser confundido com outras afeções cutâneas, estima-se que a besnoitiose bovina possa encontrar-se sub-diagnosticada noutras regiões. Assim, foi também objeto deste estudo colher informações junto dos médicos veterinários (MV) de campo, através de um questionário *online*, de modo a conhecer a prevalência e a extensão geográfica dos casos de besnoitiose bovina em Portugal e avaliar o grau de alerta para a doença. O *link* para o questionário foi enviado a todos os MV coordenadores das OPP em Portugal continental. As respostas ao questionário revelaram que o conhecimento da besnoitiose bovina é geograficamente limitado, acompanhando a aparente concentração dos casos clínicos na região do Alentejo. Entre os MV familiarizados com a doença, 71,4% atribuíram-lhe uma importância económica média a alta. Estes resultados sublinham a necessidade de divulgação do quadro clínico e dos recursos laboratoriais disponíveis para o seu diagnóstico pelo MV de campo, como forma de combater a disseminação da doença.

Por último, uma vez que a técnica de B-MAT, ao dispensar a utilização de conjugados anti-espécie, pode ser aplicada noutras espécies animais, o quinto objetivo deste estudo foi rastrear a infeção por *B. besnoiti* em potenciais hospedeiros domésticos e silváticos, candidatos a hospedeiro definitivo (carnívoros) ou intermediários (herbívoros, omnívoros). No entanto, o rastreio de *B. besnoiti*, realizado em 1297 animais, compreendendo 10 espécies carnívoras e 7 espécies herbívoras/omnívoras, não revelou a presença de anticorpos específicos.

Áreas a explorar

Concluído o trabalho, dispomos de uma nova ferramenta de diagnóstico serológico adaptada ao estudo da infeção em bovinos e outras espécies animais e de uma série de novos dados epidemiológicos relativos à besnoitiose bovina em Portugal. Estes incluem a prevalência de explorações serologicamente positivas, a prevalência média intraexploração, a distribuição geográfica da infeção, a identificação de um *cluster* geográfico de explorações positivas, a prevalência de casos clínicos, a caracterização da população afetada e a avaliação do grau de conhecimento e importância económica atribuída à doença pelos MV de campo. Não obstante, existem ainda muitas áreas a explorar no estudo da epidemiologia da besnoitiose bovina, em especial no que concerne os fatores de risco e a importância económica, o ciclo de vida do parasita, os seus hospedeiros e as vias de transmissão inter e intramanadas. Neste contexto, a identificação das explorações positivas e negativas em zonas geográficas distintas é particularmente importante, uma vez que poderão ser incluídas em futuros estudos epidemiológicos do tipo caso-controlo. O seguimento das explorações caso e controlo permitirá, ao longo do tempo, i) estabelecer um perfil de custos associado à morbidade, mortalidade, refugo precoce e perdas em carcaças, peles e leite, ii) colher e analisar os dados de manejo, ambientais, características dos animais (raça, sexo, idade, presença de infeções intercorrentes, etc.) que possam constituir fatores de risco, iii) estudar a dinâmica da transmissão da infeção na exploração, iv) avaliar o papel de potenciais hospedeiros domésticos, sinantrópicos e silváticos, bem como vetores artrópodes no ciclo de vida do parasita.

A procura de outros hospedeiros naturais de *B. besnoiti*, em especial o HD, deverá passar também pela continuação dos ensaios de infeção experimental e pelo rastreio serológico das diversas espécies candidatas existentes nas zonas geográficas coincidentes com a área de distribuição da besnoitiose bovina, levando em consideração os pontos críticos identificados neste trabalho. A evidência serológica da infeção em espécies carnívoras poderá testemunhar a existência de um ciclo do tipo predador-presa na natureza. A serologia positiva em animais que se alimentam a partir do solo, poderá indicar a contaminação ambiental com oocistos e corroborar a hipótese de transmissão oral. Assumindo que há contaminação e dispersão ambiental de formas de resistência do parasita, *B. besnoiti* poderá também ser pesquisado em amostras de água e solo colhidas nas explorações positivas, em especial aquelas com casos clínicos. Por outro lado, as características topográficas, climáticas e de cobertura vegetal, como a altitude, a temperatura, a precipitação e o uso da terra pelo homem têm mostrado influenciar a distribuição espacial de outras doenças transmitidas por artrópodes (Lambin, Tran, Vanwambeke, Linard & Soti, 2010; Reisen, 2010). A identificação

das características edafoclimáticas associadas à distribuição de *B. besnoiti* em Portugal poderá servir de ponto de partida para gerar mapas preditivos de risco de ocorrência de besnoitiose bovina noutras áreas.

Considerando a importância económica desta doença, a divulgação do quadro clínico e dos métodos de diagnóstico é essencial para sensibilizar os médicos veterinários e produtores pecuários, de modo a promover a detecção precoce da besnoitiose bovina e combater a sua disseminação. A investigação na área da epidemiologia da besnoitiose bovina é fundamental para apoiar o sector pecuário nacional, em especial no Alentejo, que concentra o maior número de bovinos e onde se regista a maior prevalência serológica e de casos clínicos.

Bibliografia

- Agosti, M., Belloli, A., Morini, M. & Vacirca, G. (1994). Segnalazione di un focolaio di Besnoitiosi in bovini da carne importati. *Praxis*, 15, 5-6.
- Alzieu, J.P., Dorchies, P., Schelcher, F. & Gottstein, B. (2007). L'extension de la besnoitiose bovine en France. *Le Point Vétérinaire*, 276, 37-43.
- Alvarez-García, G., Frey, C.F., Mora, L.M. & Schares, G. (2013). A century of bovine besnoitiosis: an unknown disease re-emerging in Europe. *Trends in Parasitology*, 29, 407-415.
- Alvarez-García, G., Fernández-García, A., Gutiérrez-Expósito, D., Quiteria, J.A., Aguado-Martínez, A. & Ortega-Mora, L.M. (2014). Seroprevalence of *Besnoitia besnoiti* infection and associated risk factors in cattle from an endemic region in Europe. *Veterinary Journal*, 200, 328-331.
- Ashmawy, K.I. & Abu-Akkada, S.S. (2013). Evidence for bovine besnoitiosis in Egypt-first serosurvey of *Besnoitia besnoiti* in cattle and water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Egypt. *Tropical animal health and production*, 46, 519-522.
- Ayroud, M., Leighton, F.A. & Tessaro, S.V. (1995). The morphology and pathology of *Besnoitia* sp. in reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*). *Journal of wildlife diseases*, 31, 319-326.
- Baldacchino, F., Gardès, L., De Stordeur, E., Jay-Robert, P., Garros, C. (2014). Blood-feeding patterns of horse flies in the French Pyrenees. *Veterinary Parasitology*, 199, 283-288.
- Barrairon (1939). Contribution à l'étude étiologique de l'anasarque du boeuf. *Récueil de médecine vétérinaire*, CXV, 565.
- Basso, W., Schares, G., Gollnick, N.S., Rütten, M. & Deplazes, P. (2011). Exploring the life cycle of *Besnoitia besnoiti* - experimental infection of putative definitive and intermediate host species. *Veterinary Parasitology*, 178, 223-234.
- Basson, P.A., McCully, R.M. & Bigalke, R.D. (1970). 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, 105-126.
- Beck, R., Štoković, I & Pleadin, J. (2013). Bovine besnoitiosis in Croatia 2nd [abstract]. In Vaz Y (Ed.), Proceedings of the 2nd International meeting on apicomplexan parasites in farm animals, Kuşadası, Turkey, 31 October-2 November, p.64.
- Berhault, G. (2008). *La besnoitiose à Besnoitia besnoiti : étude de réservoirs sauvages potentiels dans un foyer en Maine et Loire*. Dissertação de doutoramento em Medicina Veterinária. Nantes: Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes.
- Berthelon & Labeyrie (1938). Observations sur l'anasarque des Bovidés. *Réueil de Médecine Vétérinaire*, 6, 321-325.

- Besnoit, C. & Robin, V. (1912). Sarcosporidiose cutanée chez une vache. *Revue Vétérinaire*, 37, 649-663.
- Besnoit, C. & Robin, V. (1913). Les reactions cellulaires dans la sarcosporidiose cutanée. *Comptes rendus des séances de la Société de biologie et de ses filiales*, 357-360.
- Bigalke, R.D. (1968). New conception of the epidemiological features of bovine besnoitiosis as determined by laboratory investigations. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 35, 3-137.
- Bigalke, R.D., van Niekerk, J.W., Basson, P.A. & McCully, R.M. (1967). Studies on the relationship between *Besnoitia* of blue wildebeest and impala, and *Besnoitia besnoiti* of cattle. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 34, 7-28.
- Bigalke, R.D., Schoeman, J.H. & McCully, R.M. (1974). 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, 1-5.
- Bigalke, R.D. & Prozesky, L. (2004). Besnoitiosis. In: Coetzer, J.A.W., Tustin, R.C. (Eds.), *Infectious diseases of Livestock*. Oxford University Press, Cape Town, pp 351-359.
- Björkman, C., Lundén, A., Holmdahl, J., Barber, J., Trees, A.J. & Uggla, A. (1994). *Neospora caninum* in dogs: detection of antibodies by ELISA using an iscom antigen. *Parasite Immunology*, 16, 643-648.
- Björkman, C. & Hemphill, A. (1998). Characterization of *Neospora caninum* iscom antigens using monoclonal antibodies. *Parasite Immunology*, 20, 73-80.
- Björkman, C. & Lundén, A. (1998). Application of iscom antigen preparations in ELISAs for diagnosis of *Neospora* and *Toxoplasma* infections. *International Journal of Parasitology*, 28, 187-93.
- Bourdeau, P.J., Cesbron, N., Alexandre, F., Marchand, A.M., Desvaux, J.P. & Douart, A. (2004). Outbreak of bovine besnoitiosis (*Besnoitia besnoiti*) in the west of France and its diagnosis by immunofluorescence assay. In: *Proceedings of the IX European Multicolloquium of Parasitology*, Valencia, Spain, 18–23 July 2004, pp. 459-460.
- Branscum, A.J., Gardner, I.A. & Johnson, W.O. (2004). Bayesian modeling of animal- and herd-level prevalences. *Preventive Veterinary Medicine*, 66, 101-112.
- Brumpt, E. (1913). *Précis de Parasitologie* (2me ed.). Paris. Masson
- Brumpt, E. (1922). *Précis de Parasitologie* (3me éd). Paris: Masson
- Brumpt, E. (1936). *Précis de Parasitologie* (5me éd). Paris: Masson
- Bwangamoi, O. (1968). Besnoitiosis and other skin diseases of cattle (*Bos indicus*) in Uganda. *American Journal of Veterinary Research*, 29, 737-743.

- Černá, Ž. & Kvašňovská, Z (1986). Life cycle involving bird-bird relation in *Sarcocystis* coccidian with the description of *Sarcocystis accipitris* sp. *Folia Parasitologica*, 33, 305-309.
- Charles, R.A., Ellis, A.E., Dubey, J.P., Barnes, J.C. & Yabsley, M.J. (2011). Besnoitiosis in a Southern Plains Woodrat (*Neotoma micropus*) from Uvalde, Texas. *Journal of Parasitology*, 97, 838-841.
- Chatikobo, P., Chogab, T., Ncube, C. & Mutambara, J. (2013). Participatory diagnosis and prioritization of constraints to cattle production in some smallholder farming areas of Zimbabwe. *Preventive Veterinary Medicine*, 109, 327-333.
- Choquette, L.P., Broughton, E., Miller, F.L., Gibbs, H.C. & Cousineau, J.G. (1967). Besnoitiosis in barren-ground caribou in Northern Canada. *The Canadian Veterinary Journal*, 8, 282-287.
- Cortes, H., Ferreira, M.L., Silva, J.F., Vidal, R., Serra, P. & Caeiro, V. (2003). Contribuição para o estudo da besnoitiose bovina em Portugal, *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 98, 43-46.
- Cortes, H., Leitão, A., Vidal, R., Vila-Viçosa, M.J, Ferreira, M.L., Caeiro, V. & Hjerpe, C.A. (2005). Besnoitiosis in Bulls. *Veterinary Record*, 157, 262-264.
- Cortes, H.C., Reis, Y., Waap, H., Vidal, R., Soares, H., Marques, I., Pereira da Fonseca, I., Fazendeiro, I., Ferreira, M.L., Caeiro, V., Shkap, V., Hemphill, A. & Leitão, A. (2006a). Isolation of *Besnoitia besnoiti* from infected cattle in Portugal. *Veterinary Parasitology*, 141, 226-233.
- Cortes, H.C.E., Nunes, S., Reis, Y., Staubli, D., Vidal, R., Sager, H., Leitão, A. & Gottstein, B. (2006b). Immunodiagnosis of *Besnoitia besnoiti* infection by ELISA and Western blot. *Veterinary Parasitology*, 141, 216-225.
- Cortes, H.C., Mueller, N., Esposito, M., Leitão, A., Naguleswaran, A. & Hemphill, A. (2007a). In vitro efficacy of nitro- and bromo-thiazolyl- salicylamide compounds (thiazolides) against *Besnoitia besnoiti* infection in vero cells. *Parasitology*, 134, 975-985.
- Cortes, H.C., Reis, Y., Gottstein, B., Hemphill, A., Leitão, A. & Müller, N. (2007b). Application of conventional and real-time fluorescent ITS1 rDNA PCR for detection of *Besnoitia besnoiti* infections in bovine skin biopsies. *Veterinary Parasitology*, 146, 352-356.
- Cortes, H.C., Müller, N., Boykin, D., Stephens, C.E. & Hemphill, A. (2011). In vitro effects of arylimidamides against *Besnoitia besnoiti* infection in Vero cells. *Parasitology*, 138, 583-592.
- Costa, M.A. & Kulldorff, M. (2009). Applications of Spatial Scan Statistics: A Review. In: Glaz J, Pozdnyakov V, Wallenstein S (Eds.) *Scan Statistics: Methods and Applications*. Birkhäuser, Boston, pp 129-152.

- Cuillé, J.C., Chelle, P-L. & Berlureau, F. (1936). Transmission de la maladie expérimentale dénommée “Sarcosporidiose cutanée” du bœuf (Besnoit et Robin) et déterminée par *Globidium besnoiti*. *Bulletin de l'Académie nationale de médecine*, 115, 161-163.
- Curasson, G. (1943). *Traité de Protozoologie Vétérinaire et Comparé*. Paris: Vigot Frères
- Dempster, R.P. (1984). *Toxoplasma gondii*: purification of zoites from peritoneal exudates by eight methods. *Experimental Parasitology*, 57, 195-207.
- Desmonts, G. & Remington, J.S. (1980). Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: method for increasing sensitivity and specificity. *Journal of Clinical Microbiology*, 11, 562-568.
- Diesing, L., Heydorn, A.O., Matuschka, F.R., Bauer, C., Pipano, E., de Waal, D.T., Potgieter, F.T. (1988). *Besnoitia besnoiti*: studies on the definitive host and experimental infections in cattle. *Parasitology Research*, 75, 114-117.
- Dohoo, I., Martin W. & Stryhn, H. (2003). *Veterinary Epidemiological Research*, 1st edn. Transcontinental, Prince Edward Island, Canada.
- Duarte, A., Fernandes, M., Santos, N. & Tavares, L. (2012). Virological Survey in free-ranging wildcats (*Felis silvestris*) and feral domestic cats in Portugal. *Veterinary Microbiology*, 158, 400-404.
- Dubey, J.P., Desmonts, G., McDonald, C. & Walls, K.W. (1985). Serologic evaluation of cattle inoculated with *Toxoplasma gondii*: comparison of Sabin-Feldman dye test and other agglutination tests. *American journal of veterinary research*, 46, 1085-1088.
- Dubey, J.P., Thulliez, P., Weigel, R.M., Andrews, C.D., Lind, P. & Powell, E.C. (1995). Sensitivity and specificity of various serologic tests for detection of *Toxoplasma gondii* infection in naturally infected sows. *American journal of veterinary research*, 56, 1030-1103.
- Dubey, J.P., Lindsay, D.S., Rosenthal, B.M., Sreekumar, C., Hill, D.E., Shen, S.K., Kwok, O.C., Rickard, L.G., Black, S.S. & Rashmir-Raven, A. (2002). Establishment of *Besnoitia darlingi* from opossums (*Didelphis virginiana*) in experimental intermediate and definitive hosts, propagation in cell culture, and description of ultrastructural and genetic characteristics. *International Journal for Parasitology*, 32, 1053-1064.
- Dubey, J.P., Shkap, V., Pipano, E., Fish, L. & Fritz, D.L. (2003). Ultrastructure of *Besnoitia besnoiti* tissue cysts and bradyzoites. *The Journal of eukaryotic microbiology*, 50, 240-244.
- Dubey, J.P., Sreekumar, C., Lindsay, D.S., Hill, D., Rosenthal, B.M., Venturini, L., Venturini, M.C. & Greiner, E.C. (2003). *Besnoitia oryctofelisi* n. sp. (Protozoa: Apicomplexa) from domestic rabbits. *Parasitology*, 126, 521-539.
- Dubey, J.P., Sreekumar, C., Rosenthal, B.M., Vianna, M.C.B., Nylund, M., Nikander, S. & Oksanen, A. (2004). Redescription of *Besnoitia tarandi* (Protozoa: Apicomplexa) from the reindeer (*Rangifer tarandus*). *International Journal for Parasitology*, 34, 1273-1287.

- Dubey, J.P., Sreekumar, C., Donovan, T., Rozmanee, M., Rosenthal, B.M., Vianna, M.B., Davis, W.P. & Belden, J.S. (2005). Cultivation and redescription of *Besnoitia bennetti* from the donkey (*Equus asinus*). *American journal of veterinary parasitology*, 42, 715-719.
- Dubey, J.P., Schares, G. & Ortega-Mora, L.M. (2007). Epidemiology and Control of Neosporosis and *Neospora caninum*. *Clinical Microbiology Reviews*, 20, 323-367.
- Dubey, J.P. (2009). *Toxoplasmosis of Animals and Humans* (2nded.). Boca Raton: CRC Press.
- Dubey, J.P. & Yabsley, M.J. (2010). *Besnoitia neotomofelis* n. sp. (Protozoa: Apicomplexa) from the southern plains woodrat (*Neotoma micropus*). *Parasitology*, 137, 1731-1747.
- Dunson, D.B. (2001). Commentary: Practical Advantages of Bayesian Analysis of Epidemiologic Data. *American Journal of Epidemiology*, 153, 1222-1226.
- Durham, H. (1895). On a special action of the serum of highly immunised animals, and its use for diagnostic and other purposes. *Proceedings of the Royal Society of London* (1854-1905), 59 pp. 224-226. Acedido em Nov. 26, 2014 em <https://ia600600.us.archive.org/28/items/philtrans05148871/05148871.pdf>
- EFSA (2010). Bovine besnoitiosis: an emerging disease in Europe. European Food Safety Authority. *EFSA Journal*, 8, 1499-1514.
- Ellis, J.T., Holmdahl, O.J., Ryce, C., Njenga, J.M., Harper, P.A. & Morrison, D.A. (2000). Molecular phylogeny of *Besnoitia* and the genetic relationships among *Besnoitia* of cattle, wildebeest and goats. *Protist*, 151, 329-336.
- Er-Hsiang, L. (1957). Finding of *Besnoitia besnoiti* in a cattle in Peking. *Acta Parasitologica sinica*, 9, 219.
- Ernst, J.V., Chobotar, B., Oaks E.C. & Hammond, D.M. (1968). *Besnoitia jellisoni* (Sporozoa: Toxoplasmea) in rodents from Utah and California. *Journal of Parasitology*, 54, 545-549.
- Esteban-Gil, A., Grisez, C., Prevot, F., Florentin, S., Decaudin, A., Picard-Hagen, N., Berthelot, X., Ronsin, P., Alzieu, J.P., Marois, M., Corboz, N., Peglion, M., Vilardell, C., Liénard, E., Bouhsira, E., Castillo, J.A., Franc, M. & Jacquiet, P. (2014). No detection of *Besnoitia besnoiti* DNA in the semen of chronically infected bulls. *Parasitology Research*, 113, 2355-2362.
- Everitt, B.S. (1989). *Statistical Methods for Medical Investigations*. London: Oxford University Press.
- Fernández-García, A., Risco-Castillo, V., Pedraza-Díaz, S., Aguado-Martínez, A., Alvarez-García, G., Gómez-Bautista, M., Collantes-Fernández, E. & Ortega-Mora, L.M. (2009). First isolation of *Besnoitia besnoiti* from a chronically infected cow in Spain. *Journal of Parasitology*, 95, 474-476.

- Fernández-García, A., Álvarez-García, G., Risco-Castillo, V., Aguado-Martínez, A., Marcén, J.M., Rojo-Montejo, S., Castillo, J.A., Ortega-Moram, L.M. (2010). Development and use of an indirect ELISA in an outbreak of bovine besnoitiosis in Spain. *Veterinary Record*, 166, 818-822.
- Ferreira, M.L. (1985). Besnoitiose Bovina. Aspectos Anátomo- Clínicos. Tipografia Minerva Central: Maputo, R.P. Moçambique. 110 pp.
- Ferroglio, E., Rossi, L. & Gennero, S. (2000). Lung-tissue extract as an alternative to serum for surveillance for brucellosis in chamois. *Preventive Veterinary Medicine*, 43, 117-122.
- Festal (1859). Mémoire sur l'éléphantiasis du gros bétail. *Mémoires de la Société centrale de médecine vétérinaire*, 4, 19-61.
- Franco, E.E. & Borges, I. (1915). Nota sobre a sarcosporidiose bovina. *Revista de Medicina Veterinária*, Ano XIV, 255-299.
- Franco, E.E. & Borges, I. (1916). Sur la sarcosporidiose Bovine. *Arquivos do Instituto Bacteriologico Câmara Pestana*, 4, 269-289.
- Frank, W. & Frenkel, J.K. (1981). *Besnoitia* in a palaeartic lizard (*Lacerta dugesii*) from Madeira. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 64, 203-206.
- Frank, M., Klinger, I. & Pipano, E. (1970). The presence of antibody against *Besnoitia besnoiti* in dairy and beef cattle. *Journal of Protozoology*, 17, 31.
- Frenkel, J.K. (1953). Infections with organisms resembling *Toxoplasma*, together with the description of a new organism: *Besnoitia jellisoni*. *Atti VI. Congresso Internazionale di Microbiologia*, 5, 426-434.
- Frenkel, J.K. (1977). *Besnoitia wallacei* of cats and rodents: with a reclassification of other cyst-forming isosporoid coccidia. *Journal of Parasitology*, 63, 611-628.
- Fulton, J.D. (1965). Micro-agglutination Test for *Toxoplasma* Antibodies. *Immunology*, 9, 491-495.
- García-Lunar, P., Ortega-Mora, L.M., Schares, G., Gollnick, N.S., Jacquiet, P., Grisez, C., Prevot, F., Frey, C.F., Gottstein, B. & Alvarez-García, G. (2013). An inter-laboratory comparative study of serological tools employed in the diagnosis of *Besnoitia besnoiti* infection in bovines. *Transboundary and Emerging Diseases*, 60, 59-68.
- Gazzonis, A.L., Garcia, G., Zanzani, S.A., Garippa, G., Rossi, L., Maggiora, M., Dini, V., Invernizzi, A., Luini, M., Tranquillo, V.M., Mora, L. & Manfredi, M. (2014). *Besnoitia besnoiti* among cattle in insular and northwestern Italy: endemic infection or isolated outbreaks? *Parasite Vectors*, 7, 585.
- Gellé (1830). Éléphantiasis observe dans un boeuf. *Recueil de Médecine Vétérinaire*, 7, 42-46.
- Gentile, A., Militerno, G., Schares, G., Nanni, A., Testoni, S., Bassi, P. & Gollnick, N.S. (2012). Evidence for bovine besnoitiosis being endemic in Italy-First *in vitro* isolation of *Besnoitia besnoiti* from cattle born in Italy. *Veterinary Parasitology*, 184, 108-115.

- Gjerde, B. & Dahlgren, S.S. (2010). Corvid birds (Corvidae) act as definitive hosts for *Sarcocystis ovalis* in moose (*Alces alces*). *Parasitology Research*, 107, 1445-1453.
- Goldman, M. & Pipano, E. (1983). Serological studies on bovine besnoitiosis in Israel. *Tropical Animal Health and Production*, 15, 32-38.
- Gollnick, N.S., Gentile, A. & Schares, G. (2010). Diagnosis of bovine besnoitiosis in a bull born in Italy. *Veterinary Record*, 166, 599.
- Gorin, A.B., Stewart, P. & Gould, J. (1979). Concentrations of immunoglobulin classes in subcompartments of the sheep lung. *Research in Veterinary Science*, 26, 126-128.
- Grisard, E.C., Elsaid, M.M., Tafuri, W.L., Lima, J.D., Pinto, C.J., Steindel, M. & Vitor, R.W. (1997). *Besnoitia* sp. (Protozoa: Toxoplasmatinae) from *Akodon montensis* (Rodentia: Cricetidae) in Santa Catarina State, Brazil. *Journal of Parasitology*, 83, 314-316.
- Gutiérrez-Expósito, D., Ortega-Mora, L.M., Gajadhar, A.A., García-Lunar, P., Dubey, J.P. & Alvarez-García, G. (2012). Serological evidence of *Besnoitia* spp. infection in Canadian wild ruminants and strong cross-reaction between *Besnoitia besnoiti* and *Besnoitia tarandi*. *Veterinary Parasitology*, 190, 19-28.
- Gutiérrez-Expósito, D., Esteban-Gil, A., Ortega-Mora, L.M., García-Lunar, P., Castillo, J.A., Marcén, J.M., Alvarez-García, G. (2013). Prevalence of *Besnoitia besnoiti* infection in beef cattle from the Spanish Pyrenees. *Veterinary Journal*, 200, 468-470.
- Henry, A. (1913). Sarcosporidiose cutanée chez une vache. *Réveil de Médecine Vétérinaire* 327-328.
- Henry, A. & Masson, G. (1932). Coccidies (*Globidium*) parasites du tissu conjonctif, chez le cheval. *Bulletin de l'Académie vétérinaire de France*, 5, 461-464.
- Herin, V.V. (1952). Bovine globidiosis in Ruanda-Urundi. *Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale*, 32, 155-159.
- Hornok, S., Fedák, A., Baska, F., Hofmann-Lehmann, R. & Basso, W. (2014). Bovine besnoitiosis emerging in Central-Eastern Europe, Hungary. *Parasit Vectors*, 7, 20.
- Hussein, M.F. & Haroun, E.M. (1975). Bovine cutaneous besnoitiosis in the Sudan: a case report. *British Veterinary Journal*, 131, 85-88.
- Igbokwe, I.O., Abba, Y. & Nwagbara, N.D. (2009). Prevalence of *Besnoitia* Cysts in Pachydermatous Skin Lesions of Cattle in Northeastern Nigeria. *Nigerian Journal of Experimental and Applied Biology*, 10, 31-36.
- Jacobs, L., Remington, J.S. & Melton, M.L. (1960). The resistance of the encysted form of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Parasitology*, 46, 11-21.
- Jacquet, P., Liénard, E. & Franc, M. (2010). Bovine besnoitiosis: epidemiological and clinical aspects. *Veterinary Parasitology*, 174, 30-36.

- Jakubek, E-B., Mattsson, R., Mörner, T., Mattsson, J.G. & Gavier-Widén, D. (2012). Potential application of serological tests on fluids from carcasses: detection of antibodies against *Toxoplasma gondii* and *Sarcoptes scabiei* in red foxes (*Vulpes vulpes*). *Acta Veterinaria Scandinavica*, 54, 1-5.
- Janitschke, K., De Vos, A.J. & Bigalke, R.D. (1984). Serodiagnosis of bovine besnoitiosis by ELISA and immunofluorescence tests. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 51, 239-243.
- Jordan, D. & McEwen, S.A. (1998). Herd-level test performance based on uncertain estimates of individual test performance, individual true prevalence and herd true prevalence. *Preventive Veterinary Medicine*, 3, 187-209.
- Juste, R.A., Cuervo, L.A., Marco, J.C. & Oregui, L.M. (1990). La besnoitiosis bovina: desconocida en España? *Medicina Veterinaria*, 7, 613-618.
- Kiehl, E., Heydorn, A.O., Schein, E., Al-Rasheid, K.A., Selmair, J., Abdel-Ghaffar, F., Mehlhorn, H. (2010). Molecular biological comparison of different *Besnoitia* species and stages from different countries. *Parasitology Research*, 106, 889-894.
- Konstantinov, S.A. & Ul'ianov, K.N. (1988). Effect of cattle color, age, size and behavior on the intensity of the attack and sucking attachment by gadflies. *Parazitologiya*, 22, 488-495.
- Kulldorff, M. (1997). A spatial scan statistic, *Communications in Statistics. Theory and Methods*, 26, 1481-1496.
- Lambin, E.F., Tran, A., Vanwambeke, S.O., Linard, C. & Soti, V. (2010). Pathogenic landscapes: Interactions between land, people, disease vectors, and their animal hosts. *International Journal of Health Geographics*, 9, 54.
- Langenmayer, M.C., Gollnick, N.S., Majzoub-Altweck, M., Scharr, J.C. & Schares, G. (2014). Naturally Acquired Bovine Besnoitiosis: Histological and Immunohistochemical Findings in Acute, Subacute, and Chronic Disease. *Veterinary Pathology*, pii: 0300985814541705.
- Hermanns, W., Lee, H.S., Bak, U.B., Moon, M.H. & Shin, J.U. (1970). Studies on bovine besnoitiosis in Korea II. A survey on incidence in the enzootic region. *The Korean Journal of Parasitology*, 3, 76-80.
- Legrand, P. (2003). *La besnoitiose bovine en Ariège*. Dissertação de doutoramento em Medicina Veterinária. Toulouse: Ecole Nationale Vétérinaire.
- Leitão, J.L.S. (1949). Globidiose bovina por globidium besnoiti (Marotel 1912). Anasarca bovina. *Revista de Medicina Veterinaria*, 330, 152-158.
- Lesser, M., Braun, U., Deplazes, P., Gottstein, B., Hilbe, M. & Basso, W. (2012). First cases of besnoitiosis in cattle in Switzerland. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, 154, 469-474.

- Levine, N.D. & Ivens, V. (1981). The coccidian parasites (Protozoa, Apicomplexa) of carnivores. In George L. Godfrey, G.F., Karr, J.R., Lynch, M. R., Waldbauer, G.P & Young, D.A. (Eds), In *Besnoitia besnoiti*. (pp 142-148) (Urbana, Chicago, London): University of Illinois Press.
- Liénard, E., Salem, A., Grisez, C., Prévot, F., Bergeaud, J.P., Franc, M., Gottstein, B., Alzieu, J.P., Lagalisse, Y. & Jacquet, P.A. (2011). A longitudinal study of *Besnoitia besnoiti* infections and seasonal abundance of *Stomoxys calcitrans* in a dairy cattle farm of southwest France. *Veterinary Parasitology*, 177, 20-27.
- Liénard, E., Salem, A., Jacquet, P., Grisez, C., Prévot, F., Blanchard, B., Bouhsira, E. & Franc, M. (2013). Development of a protocol testing the ability of *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758) (Diptera: Muscidae) to transmit *Besnoitia besnoiti* (Henry, 1913) (Apicomplexa: Sarcocystidae). *Parasitology Research*, 112, 479-86.
- Lindsay, D.S. & Dubey, J.P. (2001). Direct agglutination test for the detection of antibodies to *Sarcocystis neurona* in experimentally infected animals. *Veterinary Parasitology*, 95, 179-186.
- Lindsay, D.S. & Dubey, J.P. (2013). Toxoplasmosis in Wild and Domestic Animals. In L.M. Weiss, K. Ki (Eds), *Toxoplasma Gondii: The Model Apicomplexan - Perspectives and Methods*. (2nd ed.). (pp. 193-215). London: Elsevier Ltd Academic Press.
- Lövgren, K., Ugglå, A., Morein, B. (1987). A New Approach to the Preparation of a *Toxoplasma gondii* Membrane Antigen for Use in ELISA. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 34, 274-282.
- Macrì, G., Sala, M., Linder, A.M., Pettirossi N. & Scarpulla, M. (2009). Comparison of indirect fluorescent antibody test and modified agglutination test for detecting *Toxoplasma gondii* immunoglobulin G antibodies in dog and cat. *Parasitology Research*, 105, 35-40.
- Madubata, C., Dunams-Morel, D.B., Elkin, B., Oksanen, A. & Rosenthal, B.M. (2012). Evidence for a recent population bottleneck in an Apicomplexan parasite of caribou and reindeer, *Besnoitia tarandi*. *Infection, Genetics and Evolution*, 12, 1605-1613.
- Majzoub, M., Breuer, W., Gollnick, N.S., Rostaher, A., Schares, G. & Hermanns, W. (2010). Ein Ausbruch von Besnoitiose bei Rindern in Deutschland: pathomorphologische, ultrastrukturelle und molekularbiologische Untersuchungen. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift*, 97, 9-15.
- Malta, M. & Silva, M. (1991). Besnoitiose no Alentejo. "IV Jornadas de Medicina Veterinária". Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa, Janeiro 15, 1991.
- Manuali, E., Lepri, E., Salamida, S., D'Avino, N., Mangili, P., Vitellozzi, G., Grelloni, V. & Filippini, G. (2011). An outbreak of bovine besnoitiosis in beef cattle born in central Italy. *Transboundary and Emerging Diseases*, 58, 464-467.
- Marotel, G. (1949). *Parasitologie Vétérinaire*. Paris: J.B Baillière et Fils.
- Matuschka, F.R. & Häfner, U. (1984). Cyclic transmission of an African *Besnoitia* species by snakes of the genus *Bitis* to several rodents. *Parasitology Research*, 70, 471-476.

- McCully, R.M., Basson, P.A., Van Niekerk, J.W. & Bigalke, R.D. (1966). Observations on *Besnoitia* cysts in the cardiovascular system of some wild antelopes and domestic cattle. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 33, 245-276.
- Mehlhorn, H., Klimpel, S., Schein, E., Heydorn, A.O., Al-Quraishy, S. & Selmair, J. (2009). Another African disease in Central Europa: Besnoitiosis of cattle. I. Light and electron microscopical study. *Parasitology Research*, 104, 861-868.
- Meireles, J., Waap, H., Lourenço, T., Vaz, Y., Peleteiro, M.C., Cortes, H.C.E. & Leitão, A. Bovine besnoitiosis in the region Centro, Portugal. VI Congresso da Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias, 3-5 April 2014, INIAV, Oeiras, Portugal. Acedido em Nov. 27 2014 em [http://turmus.fmv.utl.pt/congressospcv/images/stories/congresso2014/LivroResumos VI Congresso SPCV 2014.pdf](http://turmus.fmv.utl.pt/congressospcv/images/stories/congresso2014/LivroResumos%20VI%20Congresso%20SPCV%202014.pdf), p. 122.
- Mesnil, Chatton, & Pérard (1913). Recherches sur la toxicité d'extraits de sarcosporidies et d'autres sporozoaires. *Comptes rendus des séances de la Société de biologie et de ses filiales*, 175-178.
- Millán, J., Sobrino, R., Rodríguez, A., Oleaga, A., Gortazar C. & Schares, G. (2012). Large-scale serosurvey of *Besnoitia besnoiti* in free-living carnivores in Spain. *Veterinary Parasitology*, 190, 241-245.
- Mörner, T., Sandström, G. & Mattsson, R. (1988). Comparison of serum and lung extracts for surveys of wild animals for antibodies to *Francisella tularensis* biovar palaeartica. *Journal of Wildlife Diseases*, 24, 10-14.
- Nasir, A., Lanyona, S.R., Schares, G., Malcolm Anderson, M.L. & Reichel, M.P. (2012). Sero-prevalence of *Neospora caninum* and *Besnoitia besnoiti* in South Australian beef and dairy cattle. *Veterinary Parasitology*, 186, 480-485.
- Ness, S.L., Peters-Kennedy, J., Schares, G., Dubey, J.P., Mittel, L.D., Mohammed, H.O., Bowman, D.D., Felipe, M.J., Wade, S.E., Shultz, N. & Divers, T.J. (2012). Investigation of an outbreak of besnoitiosis in donkeys in northeastern Pennsylvania. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 240, 1329-1337.
- Neuman, M. (1962). The experimental infection of the gerbil (*Meriones tristrami shanii*) with *Besnoitia besnoiti*. *Refuah Veterinarith*, 19, 184-188.
- Neuman, M. (1972). Serological Survey of *Besnoitia besnoiti* (Marotel 1912) Infection in Israel by Immunofluorescence. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B*, 19, 391-396.
- Neuman, M. & Nobel, T.A. (1981). Observations on the Pathology of Besnoitiosis in Experimental Animals. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B*, 28, 345-354.
- Neveu-Lemaire, M. (1943). *Traité de Protozoologie Médicale et Vétérinaire*. Paris: Vigote Frères.
- Njagi, O.N., Ndarathi, C.M., Nyaga, P.N & Munga, L.K. (1998). An epidemic of Besnoitiosis in cattle in Kenya. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 65, 133-136.
- Njenga, J.M., Bwangamoi, O., Kangethe, E.K., Mugeru, G.M. & Mutiga, E.R. (1995). Comparative ultrastructural studies on *Besnoitia besnoiti* and *Besnoitia caprae*. *Veterinary Research Communications*, 19, 295-308.

- Olias, P., Schade, B. & Mehlhorn, H. (2011). Molecular pathology, taxonomy and epidemiology of *Besnoitia* species (Protozoa: Sarcocystidae). *Infection, Genetics and Evolution*, 11, 1564-1576
- Olopoenia, L.A. & King, A.L. (2000). Widal agglutination test - 100 years later: still plagued by controversy. *Journal of Postgraduate Medicine*, 76, 80-84.
- Packham, A.E., Sverlow, K.W., Conrad, P.A., Loomis, E.F., Rowe, J.D., Anderson, M.L., Marsh, A.E., Cray, C. & Barr, B.C. (1998). A Modified Agglutination Test for *Neospora caninum*: Development, Optimization, and Comparison to the Indirect Fluorescent-Antibody Test and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Clin Diagn Lab Immunol*, 5, 467-473.
- Péllerdy, P. (1974). *Coccidia and coccidiosis*. (2nd Ed.). Berlin und Hamburg: Paul Parey.
- Pelosse, P., Kribs-Zaleta, C.M. (2012). The role of the ratio of vector and host densities in the evolution of transmission modes in vector-borne diseases. The example of sylvatic *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Theoretical Biology*, 312, 133-142.
- Pinto, C. (Ed.) (1944). *Doenças infecciosas e parasitárias dos animais domésticos*. Rio de Janeiro: Editora Científica
- Pipano, E. (1997). Vaccines against hemoparasitic diseases in Israel with special reference to quality assurance. *Tropical Animal Health and Production*, 29, 86S-90S.
- Pols, J.W. (1960). Studies on bovine besnoitiosis with special reference to the aetiology. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 28, 265-356.
- Pradal (1837). Phlegmasie cutanée. *Réveil de Médecine Vétérinaire pratique*, 107-110.
- Reis, Y., Cortes, H.C., Viseu Melo, L., Fazendeiro, I., Leitão, A. & Soares, H. (2006). Microtubule cytoskeleton behaviour in the initial steps of host cell invasion by *Besnoitia besnoiti*. *FEBS Letters*, 580, 4673-4682.
- Reisen, W.K. (2010). Landscape Epidemiology of Vector-Borne Diseases. *Annual Review of Entomology*, 55, 461-483.
- Rinaldi, L., Maurelli, M.P., Musella, V., Bosco, A., Cortes, H. & Cringoli, G. (2013). First cross-sectional serological survey on *Besnoitia besnoiti* in cattle in Italy. *Parasitology Research*, 112, 1805-1807.
- Roche-Lubin (1859). Essai pratique sur l'éléphantiasis du gros bétail. *Mémoires de la Société centrale de médecine vétérinaire*, 4, 1-18.
- Romand, S., Thulliez, P. & Dubey, J.P. (1997). Direct agglutination test for serologic diagnosis of *Neospora caninum* infection. *Parasitology Research*, 80, 50-53.
- Rommel, M. (1975). Neue Erkenntnisse zur Biologie der Kokzidien, Toxoplasmen, Sarkosporidien und Besnoitien. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift*, 88, 112-117.

- Rostaher, A., Mueller, R.S., Majzoub, M., Schares, G. & Gollnick, N. (2010). Bovine besnoitiosis in Germany. *Veterinary Dermatology*, 21, 329-334.
- Sabin, A.B. & Feldman, A.H. (1948). Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (*Toxoplasma*). *Science*, 108, 660-663.
- Sambo, S.J., Ibrahim, N.D.G, Esievo, K.A.N., Hambolu, J.O., Oladele, S.B., Sackey, A.K.B. & Makoshi, S.M. (2007). Co-Existence of Besnoitiosis and Dermatophilosis in Indigenous Cattle Slaughtered at Zaria Abattoir. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 6, 617-620.
- Sambo, S.J., Ibrahim, N.D.G., Esievo, K.A.N. & Kazeem, H.M. (2014). Prevalence of *Besnoitia besnoiti* antibodies in bovine sera and milk in Northern Nigeria. *Sokoto Journal of Veterinary Sciences*, 12, 29-35.
- Sannusi, A. (1991). A simple field diagnostic smear test for bovine besnoitiosis. *Veterinary Parasitology*, 39,185-188.
- Santin (1859). Éléphantiaïis du boeuf et de la vache. *Mémoires de la Société centrale de médecine vétérinaire*, 4, 63-72.
- Santos, N., Almendra, C. & Tavares, L. (2009). Serologic survey for canine distemper virus and canine parvovirus in free-ranging wild carnivores from Portugal. *Journal of Wildlife Diseases*, 45, 221-226.
- Schares, G., Basso, W., Majzoub, M., Cortes, H.C., Rostaher, A., Selmair, J., Hermanns, W., Conraths, F.J. & Gollnick, N.S. (2009). First *in vitro* isolation of *Besnoitia besnoiti* from chronically infected cattle in Germany. *Veterinary Parasitology*, 163, 315-322.
- Schares, G., Basso, W., Majzoub, M., Rostaher, A., Scharr, J.C., Langenmayer, M.C., Selmair, J., Dubey, J.P., Cortes, H.C., Conraths, F.J., Gollnick, N.S. (2010). Comparative evaluation of immunofluorescent antibody and new immunoblot tests for the specific detection of antibodies against *Besnoitia besnoiti* tachyzoites and bradyzoites in bovine sera. *Veterinary Parasitology*, 171, 32-40.
- Schares, G., Basso, W., Majzoub, M., Rostaher, A., Scharr, J.C., Langenmayer, M.C., Selmair, J., Dubey, J.P., Cortes, H.C., Conraths, F.J., Haupt, T., Pürro, M., Raeber, A., Buholzer, P. & Gollnick N.S. (2011a). Evaluation of a commercial ELISA for the specific detection of antibodies against *Besnoitia besnoiti*. *Veterinary Parasitology*, 175, 52-59.
- Schares, G., Maksimov, A., Basso, W., Moré, G., Dubey, J.P., Rosenthal, B., Majzoub, M., Rostaher, A., Selmair, J., Langenmayer, M.C., Scharr, J.C., Conraths, F.J. & Gollnick, N.S. (2011b). Quantitative real time polymerase chain reaction assays for the sensitive detection of *Besnoitia besnoiti* infection in cattle. *Veterinary Parasitology*, 178, 208-216.
- Schares, G., Langenmayer, M.C., Scharr, J.C., Minke, L., Maksimov, P., Maksimov, A., Schares, S., Bärwald, A., Basso, W., Dubey, J.P., Conraths, F.J. & Gollnick, N.S. (2013). Novel tools for the diagnosis and differentiation of acute and chronic bovine besnoitiosis. *International Journal for Parasitology*, 43, 143-154.

- Scharr, J. (2012). Spektrum potentieller Vektoren für die mechanische Übertragung von *Besnoitia besnoiti* beim Rind: Entomologische Untersuchungen zum Vorkommen von Insektenpezies der Familien Tabanidae und Muscidae (Diptera) im Landkreis Erding, Bayern. Baviera: Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Schneider, C.R. (1967). The Distribution of Lizard Besnoitiosis in Panama, and its transfer to mice. *The Journal of Protozoology*, 14, 674–678.
- Schneider, C.R. (2007). *Besnoitia darlingi* (Brumpt, 1913) in Panama. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 14, 78-82.
- Schofield, S. & Torr, S.J. (2002). A comparison of the feeding behaviour of tsetse and stable flies. *Medical and Veterinary Entomology*, 16, 177-185.
- Sénaud, J., Heydorn, A.O. & Mehlhorn, H. (1984). Three new types of globidium of sheep: an *in vivo* and *in vitro* investigation. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 70, 721-729.
- Sergeant, E.S.G. (2014). Epitools epidemiological calculators. AusVet Animal Health Services and Australian Biosecurity Cooperative Research Centre for Emerging Infectious Disease. Available at: <http://epitools.ausvet.com.au>.
- Shaapan, R.M., El-Nawawi, F.A., Tawfik, M.A. (2008). Sensitivity and specificity of various serological tests for the detection of *Toxoplasma gondii* infection in naturally infected sheep. *Veterinary Parasitology*, 153, 359-362.
- Shkap, V., Ungar-Waron, H., Pipano, E. & Greenblatt, C. (1984). Enzyme linked immunosorbent assay for detection of antibodies against *Besnoitia besnoiti* in cattle. *Tropical Animal Health and Production*, 16, 233-238.
- Shkap, V., de Waal, D.T. & Potgieter, F.T. (1985). Chemotherapy of experimental *Besnoitia besnoiti* infection in rabbits. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 52, 289.
- Shkap, V., Pipano, E. & Greenblatt, C. (1987a). Cultivation of *Besnoitia besnoiti* and evaluation of susceptibility of laboratory animals to cultured parasites. *Veterinary Parasitology*, 23, 169-178.
- Shkap, V., Pipano, E. & Ungar-Waron, H. (1987b). *Besnoitia besnoiti*: chemotherapeutic trials *in vivo* and *in vitro*. *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux*, 40, 259-264.
- Shkap, V. & Pipano, E. (1993). The route of immunization of gerbils with live *Besnoitia besnoiti* as a factor in protection against lethal challenge. *Veterinary Parasitology*, 51, 27-33.
- Shkap, V., Pipano, E., Marcus, S. & Krigel, Y. (1994). Bovine besnoitiosis: transfer of colostral antibodies with observations possibly relating to natural transmission of the infection. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 61, 273-275.
- Shkap, V., Reske, A., Pipano, E., Fish, L. & Baszler, T. (2002). Immunological relationship between *Neospora caninum* and *Besnoitia besnoiti*. *Veterinary Parasitology*, 106, 35-43
- Smith, D.D. & Frenkel, J.K. (1977). *Besnoitia darlingi* (Protozoa: Toxoplasmatinae): cyclic transmission by cats. *Journal of Parasitology*, 63, 1066-1071.

- Smith, D.D. & Frenkel, J.K. (1984). *Besnoitia darlingi* (Apicomplexa, Sarcocystidae, Toxoplasmatinae): transmission between opossums and cats. *Journal of Protozoology*, 31, 584-587.
- Smith, R.D. (2006). *Veterinary clinical epidemiology*, (3rd ed). Boca Raton: CRC Press
- Suzuki, Y. & Remington, J.S. (1990). Importance of membrane-bound antigens of *Toxoplasma gondii* and their fixation for serodiagnosis of toxoplasmic encephalitis in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Journal of Clinical Microbiology*, 28, 2354-2356.
- Tadros, W. & Laarman, J.J. (1982). Besnoitiosis and Besnoitia isosporiasis. In W.H.R.Lumsden, R.Muller & J.R. Baker (Eds). *Advances in Parasitology*, 20, 335-342.
- Taiche (1831). Observations et réflexions sur l'él'phantiasis des boeufs. *Récul de Médecine Vétérinaire*, 8, 229-231.
- Tenter, A.M., Heckeroth, A.R. & Weiss, L.M. (2000). *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International Journal for Parasitology*, 30, 1217-1258.
- Thiéry, G. & Mémary, G. (1961). La streptothricose cutanée. IV, Étiologie - traitement - prophylaxie. *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux*, 14, 413-427.
- Titford, M. (2006). A Short History of Histopathology Technique: *The Journal of Histotechnology*, 29, 99-110.
- Torr, S. & Mangwiwo, T.N. (2000). Interactions between cattle and biting flies: effects on the feeding rate of tsetse. *Medical and Veterinary Entomology*, 14, 400-409.
- Torr, S.J., Mangwiwo, T.N.C. & Hall, D.R. (2006). The effects of host physiology on the attraction of tsetse (Diptera: Glossinidae) and *Stomoxys* (Diptera: Muscidae) to cattle. *Bulletin of entomological research*, 96, 71-84.
- Uggla, A. & Buxton, D. (1990). Immune responses against *Toxoplasma* and *Sarcocystis* infections in ruminants: diagnosis and prospects for vaccination. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 9, 441-462.
- Uggla, A., Hilali, M. & Lövgren, K. (1987). Serological responses in *Sarcocystis cruzi* infected calves challenged with *Toxoplasma gondii*. *Research in Veterinary Science*, 43, 127-129.
- Venturini, L., Petruccelli, M., Píscopo, M., Unzaga, J.M., Venturini, M.C., Bacigalupe, D., Basso, W. & Dubey, J.P. (2002). Natural *Besnoitia* sp. infection in domestic rabbits from Argentina. *Veterinary Parasitology*, 107, 273-278.
- Waap, H., Cortes, H. & Leitão, A. (2010). Preliminary data on *Besnoiti besnoiti* seroprevalence in cattle herds in Portugal [abstract] [versão eletrónica]. Conference abstracts of the XII ICOPA (International Congress of Parasitology), Melbourne, Australia, 15-20 August, 2010, abs 1924. Acedido em Nov. 27, 2014 em: <http://parasitology1000.blog.com/files/2011/02/ICOPA-cdfile-final1.pdf>

- Waap, H., Cardoso, R., Marcelino, E., Malta, J., Cortes, H. & Leitão, A. (2011). A modified agglutination test for the diagnosis of *Besnoitia besnoiti* infection. *Veterinary Parasitology*, 178, 217-222.
- Waap, H., Cardoso, R., Leitão, A., Nunes, T., Vilarés, A., Gargaté, M.J., Meireles, J., Cortes, H. & Angelo, H. (2012). *In vitro* isolation and seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in stray cats and pigeons in Lisbon, Portugal. *Veterinary Parasitology*, 187, 542-547.
- Wallace, G.D. & Frenkel, J.K. (1975). *Besnoitia* Species (Protozoa, Sporozoa, Toxoplasmatidae): Recognition of Cyclic Transmission by Cats. *Science*, 188, 369-371.
- Waller, T., Lyngset, A., Elvander, M. & Morein, B. (1980). Immunological diagnosis of encephalitozoonosis from post-mortem specimens. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1, 353-360.
- Weatherall, D.J. (2011). The Specificity of Serological Reactions by Karl Landsteiner (1936), Charles C. Thomas, Springfield, Illinois. *FASEB Journal*, 25, 2513-2514.
- Wenyon, C.M. (1926). Protozoology. New York: Wiliam Wood and Company.
- Wobeser, G. (1976). Besnoitiosis in a woodland caribou. *Journal of wildlife diseases*, 12, 566-571.

Anexo 1

Espécies e número de animais testados para identificação de potenciais hospedeiros definitivos.

Classe	Família	Nome espécie	Nome comum	n	Referência		
Mammalia	Felidae	<i>Felis catus</i>	Gato doméstico	2	Peteshev <i>et al.</i> , 1974 ¹⁶		
				14	Rommel, 1975		
				4	Diesing <i>et al.</i> , 1988		
				5	Basso <i>et al.</i> , 2011		
			<i>Felis lybica</i>	Gato da Líbia	1	Peteshev <i>et al.</i> , 1974 ¹⁶	
			<i>Leptailurus serval</i>	Serval	1	Rommel, 1975	
			<i>Felis chaus</i>	Gato da selva	2	Diesing <i>et al.</i> , 1988	
			<i>Caracal caraca</i>	Lince do deserto	2		
			<i>Panthera leo</i>	Leão	1		
			<i>Panthera pardus</i>	Leopardo	3		
			<i>Acinonyx jubatus</i>	Chita	2		
			Canidae	<i>Canis familiaris</i>	Cão	1	Pols, 1960
						?	Peteshev <i>et al.</i> , 1974 ¹⁶
					1	Diesing <i>et al.</i> , 1988	
					28	Rommel <i>et al.</i> , 1975	
					6	Basso <i>et al.</i> , 2011	
				<i>Canis lupus</i>	Lobo	?	Peteshev <i>et al.</i> , 1974 ¹⁶
				<i>Vulpes corsac</i>	Raposa das Estepes	?	
		Viverridae	<i>Canis mesomelas</i>	Chacal dorso negro	2	Diesing <i>et al.</i> , 1988	
			<i>Vulpes chama</i>	Raposa do Cabo	1		
	Viverridae	<i>Genetta genetta</i>	Geneta	2	Diesing <i>et al.</i> , 1988		
	Herpestidae	<i>Mungos mungo</i>	Mangusto listrado	2			
		<i>Atilax paludinosus</i>	Mangusto dos pântanos	1			
Aves	Corvidae	<i>Corvus frugilegus</i>	Corvo	?	Peteshev <i>et al.</i> , 1974 ¹⁶		
	Ciconiida	<i>Leptoptilos crumeniferus</i>	Marabu	4	Rommel, 1975		
	Acciptridae	<i>Pseudogyps africanus</i>	Grifo do Cabo	11			
Reptilia	Colubridae	<i>Teloscopus dhara</i>	Cobra tigre negro	2			
		<i>Malpolon monspessulanus</i>	Cobra rateira	3			
		<i>Coluber ravergieri</i>	Cobra	8			
		<i>Coluber jugularis</i>	Cobra chicote	3			
	Viperidae	<i>Vipera palestinae</i>	Víbora da Palestina	2			
		<i>Bitis arietans</i>	Víbora assopradora	2			

Anexo 2

Revisão dos estudos de infecção experimental: nº de espécies testadas, forma parasitária inoculada, dose, sinais clínicos, métodos de confirmação e referências bibliográficas.

Família	Espécie	Via		Forma parasit.	n	Dose/matriz	Sinais clínicos	Confirmação	Referência					
		infecção												
Bovidae	Bovinos	ic,	sc,	Bradizoítos	?	? Homog. pele bov.	Assint.	---	(Besnoit e Robin, 1912)					
		enx.	sc,											
		im												
		iv	Taquiz.							3	100, 150, 1000 cm ³ sangue bov.	Sintom. (agudos, crón., morte)	Esfreg.-, Quistos+	(Cuillé et al., 1936)
		iv	Bradiz.							2	5ml suspensão quistos/50kg pv	Assint.	---	(Pols 1960)
		sc	Bradiz.							2	5ml suspensão quistos/50kg pv	Assint.	---	
		enx. sc	Bradizoítos							1	4cm ² pele	Assint.	---	
		iv	Taquiz.							3	1 L sangue bov.	2 Sintom. , 1 assint	3Quistos +, 1 esfreg.+	
		iv	Taquiz.							1	250 ml sangue bov.	Sintom.	Esfreg.+	
		parent.	Taquiz							1	13ml sangue coelho	Sintom.	Quistos+	
		oral	Taquiz							2	Vísceras coelho	Sintom. (pirexia)	2 Esfreg.-, 2 Bioenss.+, 1Quistos+, 2	(Bigallke, 1968)
		oral	Bradiz.							2	Homog. pele bov.	Assint.	Bioenss.-, 2 Imun.-	
		in	Bradiz.							2	(2,22-4,2x10 ⁶) homog. pele bov.	2 Sintom. (pirexia)	2 Esfreg.-, 2 Bioenss. +, 2 Quistos+,	
		iv	Taquiz.							7	Susp. test./sangue coelho, cult. cel., sangue bov (6x10 ⁶ -98,5x10 ⁶)	Sintom. (ligeiros,acent., morte)	Quistos +	(Basson et al., 1970)
		oral	Oocistos							1	Oocistos incubados na água	Sintom.	---	(Peteshev et al., 1974)
		parent.	Taquiz.?							?	Animais de laboratório	Sintom. (pirexia)	Bioenss. +, Quistos -	(Neuman e Nobel, 1981)
		Ovinos	Ovinos							iv	Taquiz.	1	350 ml sangue coelho	Sintom. (pirexia)
iv	Taquiz.			1	30 ml sangue coelho	Sintom. (pirexia)	Bioenss. coelho +, Quistos-							
iv	Taquiz.			2	50 ml sangue ovino	Sintom. (pirexia)	Bioenss. coelho +, Esfreg.- Quistos-							
oral	Bradiz.			?	Quistos tecido bov.	Sintom. (forma crónica)	---	(Peteshev et al., 1974)						
oral	Oocistos			?	Oocistos esporulados na água	Sintom. (pirexia, forma crónica)	Esfreg.+, Quistos+	(Peteshev et al., 1975)						
			Taquiz.		Culturas de células	Sintom. acent.	(Kvahn, 1976)							

Revisão dos estudos de infecção experimental: nº de espécies testadas, forma parasitária inoculada, dose, sinais clínicos, métodos de confirmação e referências bibliográficas (continuação).

Família	Espécie	Via		n	Dose/matriz	Sinais clínicos	Confirmação	Referência
		infecção	Forma parasit.					
Bovidae	Caprinos	iv	Taquiz.	1	350 ml sangue coelho	Sinais (edemas, alopecia)	Inoc. exper. coelho +, Quistos+	(Pols, 1960)
		iv	Taquiz.	1	30 ml sangue coelho	Sinais (pirexia)	Inoc. exper. coelho +, Quistos +	
		iv	Taquiz.	2	50 ml sangue caprino	Sinais (pirexia)	Inoc. exper. coelho +, Esfreg.- Quistos-	
		oral	Bradiz.	?	Quistos tecido bov.	Sinais (forma crónica)	---	(Peteshev <i>et al.</i> , 1974) ¹⁶
		oral	Oocistos	?	Esporulados na água	Sinais (pirexia, forma crónica)	Taquiz. sangue, Quistos +	(Peteshev <i>et al.</i> , 1975) ¹⁷
		parent.	Taquiz.?	?	Animais de laboratório	Sinais (pirexia)	Inoc. exper. +, Quistos +	(Neuman e Nobel, 1981)
	<i>Saiga tatarica</i>	?	Taquiz		Culturas de células	Sinais acent. (morte)	(Khvan, 1969) ¹⁵	
Equidae	Cavalo	iv	Taquiz.	2	30 ml sangue coelho, 30 ml susp. fígado e baço	Sem sinais	---	(Pols, 1960)
Leporidae	Coelho	oral	Bradiz.	?	? Homog. pele bov.	Sem sinais	---	(Besnoit e Robin, 1912)
		iv	Taquiz.	1	3 ml sangue bov.	Sinais (morte)	Esfreg. +	(Pols, 1960)
		ip	Taquiz.	1	5 ml sangue bov., coelho	Sinais	Esfreg. +	
		sc	Taquiz.	1	10 ml sangue bov.	Sinais	Esfreg. +	
		sc	Taquiz.	1	5 ml liquid. edematoso coelho	Sinais (morte)	Esfreg. +	
		ip	Taquiz.	1	5 ml susp. baço coelho	Sinais (morte)	Esfreg. +	
		oral	Taquiz.	2	10 ml susp. baço+fígado	Sem sinais (controles+)	Imun.-	
		oral	Taquiz.	4	20-30 ml susp. fezes + urina	Sem sinais.	Imun.-	
		io	Bradiz.	3	0,75-1ml homog. pele bov.	Sinais (pirexia)	Bioenss +, Quistos+	(Bigalke, 1968)
		in	Bradiz.	2	1ml homog. pele bov.	Sinais (pirexia)	2Esfreg.+, 1Bioenss.+	
		sc	Bradiz.	1	8ml homog. pele bov	Sinais acent.	Quistos+	(Basson <i>et al.</i> , 1970)
		ip	Taquiz.	8	5ml sangue coelho	Sinais acent.	Quistos+	
		parent.	Taquiz.?	?	Susp. parasitas, líquido perit.	Sinais (pele e SNC)	Esfreg.+, Quistos-, parasit. vísceras e fluidos	(Neuman e Nobel, 1981)
			ip	Taquiz.		Taquiz. cultura	Sinais	
	ip	Bradiz., Taquiz.	2	10 ⁷ bradiz. bov., 10 ⁷ taquiz. cultura	Sem sinais.	Quistos-, Serol.+	(Cortes <i>et al.</i> , 2006)	

Revisão dos estudos de infecção experimental: nº de espécies testadas, forma parasitária inoculada, dose, sinais clínicos, métodos de confirmação e referências bibliográficas (continuação).

Família	Espécie	Via		n	Dose/matriz	Sinais clínicos	Confirmação	Referência	
		infecção	Forma parasit.						
Leporidae	Coelho	sc	5x10 ⁵ Taquiz.	3	Cultura céls. BbGER-1	Sinais	Serol+; 1 Quisto+; 3PCR+	(Basso 2011)	
		sc	5x10 ⁵ Bradiz.	3	Homog. pele bov.	Sem sinais	Sero+; 2 Quistos+; 3PCR+	(Basso 2011)	
	<i>Lepus tolai</i>	?	?	?	Material origem bov.	Sinais agudos (morte)	Merozoítos nas vísceras	(Peteshev <i>et al.</i> , 1976) ¹⁸	
Muridae	Rato	oral	Bradiz.	?	? Homog. pele bov.	Sem sinais.	---	(Besnoit e Robin, 1912)	
		oral, sc	Bradiz.	?	? Homog. pele bov.	Sem sinais.	---	(Franco e Borges, 1915,1916)	
		ip	Taquiz.	?	Sangue bov.	Sem sinais.	---	(Pols, 1960)	
		ip, sc	Taquiz.	6	2 ml sangue coelho	Sem sinais.	Esfregaço -		
		ip	Taquiz	?	Taquiz. cultura	Sem sinais.	Serol.+	(Shkap <i>et al.</i> , 1987 ^a)	
	Ratinho	oral	Bradiz.	?	?		Sem sinais.	---	(Besnoit e Robin, 1912)
		oral, sc	Bradiz.	?	? Suspensão quistos		Sem sinais.	---	(Franco e Borges, 1915)
		ip	Taquiz.	?	Sangue bov.		Sem sinais.	---	(Pols, 1960)
		ip, sc	Taquiz.	16	1-2 ml sangue coelho		Sem sinais.	Esfregaço -	
		oral	Bradiz.	?	Quistos tecido bov.		Sinais (forma crônica)	---	(Peteshev <i>et al.</i> , 1974 ¹⁶)
		oral	Oocistos	?	Esporulados na água		Sinais	---	(Peteshev <i>et al.</i> , 1975 ¹⁷)
		parent.	Taquiz.	?	Sangue caprino (infetado oocistos)		?	Inoc. exper. gato+	
		parent.	Bradiz.	?	Quistos tecido bov.		?	Parasitas cavid. abdom., vísceras	(Pak, 1976 [cit. Levine, 1981])
		parent.	Taquiz.?	?	Susp. parasitas, líquido perit.		Sinais (pele e SNC)	Esfreg.+; Quistos-, parasit. vísceras e fluidos	(Neuman e Nobel, 1981)
<i>Psammomys obesus</i>	sc	5x10 ⁵ Taquiz.	4	Cultura céls. BbGER-1		Sem sinais.	Serol. +;1Quisto+; 4PCR+	(Basso 2011)	
	sc	5x10 ⁵ Bradiz.	4	Homog. pele		Sem sinais.	Serol.+; 1Quisto+; 4 PCR+		
	ip	Taquiz.		Taquiz. cultura		Sinais (fatal)		(Shkap <i>et al.</i> , 1987a)	
	parent.	Bradiz.	?	?		Sinais	?	(Neuman, 1962)	
Gerbilo	parent.	Taquiz.?	?	Susp. parasitas, líquido perit.		Sinais (pele e SNC)	Esfreg.+; Quistos-, parasit. vísceras e fluidos	(Neuman e Nobel, 1981)	

Revisão dos estudos de infecção experimental: nº de espécies testadas, forma parasitária inoculada, dose, sinais clínicos, métodos de confirmação e referências bibliográficas (continuação).

Família	Espécie	Via infecção	Forma parasit.	n	Dose/matriz	Sinais clínicos	Confirmação	Referência	
Muridae	Gerbilo	ip	Taquiz.		Taquiz. de cultura	Sinais (fatal)	Serol. +	(Shkap <i>et al.</i> , 1987a) (Shkap e Pipano, 1993)	
		sc	5x10 ⁵ Taquiz.	3	Cultura céls. BbGER-1	Sem sinais.	Serol. +, 2Quisto+;3PCR+	(Basso 2011)	
		sc	5x10 ⁵ Bradiz.	3	Homog. pele	Sem sinais.	Serol. +; 2Quisto+; 3PCR+		
	<i>Rhombomys opimus</i>	?	?	?	Material origem bov.	Sinais agudos (morte)	Merozoítos vísceras	(Peteshev <i>et al.</i> , 1976 ¹⁸)	
Caviidae	Cobaio	ip	Taquiz.	?	Sangue bov.	Sem sinais.	---	(Pols, 1960)	
		ip, sc	Taquiz.	16	2-3 ml sangue coelho	10 Sinais (febre)	Esfregaço -		
		parent.	Taquiz.?	?	Susp. parasitas, líquido perit.	Sinais (pele e SNC)	Esfreg.+; Quistos-, parasit. vísceras e fluidos	(Neuman e Nobel, 1981)	
		sc	Taquiz.	3	Cultura céls. BbGER-1	Sem sinais.	Serol. +, Quistos-; PCR+	(Basso 2011)	
		sc	Bradiz.	3	Homog. pele	Sem sinais.	Serol. +, Quistos-; PCR+		
	<i>Petromus typicus</i>	ip, sc	Taquiz.	4	2-3 ml sangue bov.	Sem sinais.	---	(Pols, 1960)	
Cricetidae	Hamster	ip	Taquiz.	2	2 ml sangue coelho	Sem sinais.	Esfregaço -		
		parent.	Bradiz.	?	?	Sinais	?	Neuman e Nobel, 1962	
		sc	Taquiz.	(7 ^a) 1	4ml sangue coelho	Sem sinais.	Inoc. exper. +	(Bigalke, 1968)	
		ip	pass.)	26	0,5-2 ml sangue hamster	Sem sinais.	15% Esfregaço.+; >ia bioenss. +		
			Taquiz. (160 ^a pass.)						
		parent.	Taquiz.?	?	Susp. parasitas, líquido perit.	Sinais (pele e SNC)	Esfreg.+; Quistos-, parasit. vísceras e fluidos	(Neuman e Nobel, 1981)	
		Ip	Taquiz.		Taquiz. cultura	Sem sinais.	Serol. +	(Shkap <i>et al.</i> , 1987a)	
	<i>Odantra zibethicus</i>	?	?	?	Material origem bov.	Sinais agudos (morte)	Merozoítos nas vísceras	(Peteshev <i>et al.</i> , 1974 ¹⁶)	
	<i>Microtus guentheri</i>	Ip	Taquiz.		Taquiz. cultura	Sem sinais.	Serol. +	(Shkap <i>et al.</i> , 1987a)	
	<i>Microtus arvalis</i>	?	?	?	Material origem bov.	Sinaism agudos (morte)	Merozoítos nas vísceras	(Peteshev <i>et al.</i> , 1974 ¹⁶) (Basso 2011)	

Revisão dos estudos de infecção experimental: nº de espécies testadas, forma parasitária inoculada, dose, sinais clínicos, métodos de confirmação e referências bibliográficas (continuação).

Família	Espécie	Via infecção	Forma parasit.	n	Dose/matriz	Sinais clínicos	Confirmação	Referência
Cricetidae	<i>Microtus</i>	Sc	5x10 ⁵ taquiz.	3	Cultura céls. BbGER-1	Sem sinais.	Serol. +, 1Quisto+;3PCR+	
	<i>arvalis</i>	Sc	5x10 ⁵ bradiz.	4	Homog. pele	Sem sinais.	Serol. +; 2Quisto+; 3PCR+	
Petromuridae	<i>Petromus</i> <i>typicus</i>	Ip	Taquiz.	4	4 ml sangue coelho	Sem sinais.	Esfregaço -	(Pols, 1960)
Sciuridae	Esquilo	oral.	Bradiz.	?	Quistos tecido bov.	Sinais agudos (morte)	Todos os órgãos infetados	(Peteshev <i>et al.</i> , 1975 ¹⁷)
	terrestre	parent.	?/bradiz.	?	Sangue bov./quistos bovino	Sinais agudos (morte)	Todos os órgãos infetados	
		oral	Oocistos		Esporulados na água	Sinais		
		oral	Oocistos		Isolados de gatinhos infetados com cérebro de rato	Infeção		
	<i>Citellus</i> <i>pulvus</i>	parent.	Bradiz.		Quistos tecido bov.		Parasitas cavid. abd., vísceras	(Pak, 1976 [cit. Levine, 1981])
Erinaceidae	Ouriço	?	?	?	?	Sem sinais.	---	(Peteshev <i>et al.</i> , 1975 ¹⁷)
	Marmota	?	?	?	Material origem bov.	Sinais agudos (morte)	Merozoítos nas vísceras	(Peteshev <i>et al.</i> , 1974 ¹⁶)
Passeridae	<i>Passer</i> <i>montanus</i>	?	?	?	Material origem bov.	Sinais agudos (morte)	Merozoítos nas vísceras	(Peteshev <i>et al.</i> , 1976 ¹⁸)
Phasianidae	Frangos	ip, sc, iv	Taquiz.	8	2-3 ml sangue coelho	Sem sinais.	Esfregaço -	(Pols, 1960)
	Galinhas	ip, sc, iv	Taquiz.	6	3-5 ml sangue coelho	Sem sinais.	Esfregaço -	
	Galos	sc, iv	Taquiz.	2	3-5 ml sangue coelho	Sem sinais.	Esfregaço -	

Anexo 3

3.1. Soros analisados por freguesia e concelho na região NUTS 2 Norte.

NUTS2 NORTE			
Concelhos	Total soros	Positivos	Prevalência (%)
Freguesias			
Alfândega da Fé	78	---	---
Gebelim	12	---	---
Vale Pereiro	66	---	---
Amarante	10	---	---
Ataíde	10	---	---
Amares	70	---	---
Amares	5	---	---
Dornelas	38	---	---
Goães-Amares	21	---	---
Paredes Secas	6	---	---
Arcos de Valdevez	90	---	---
Monte Redondo	90	---	---
Barcelos	178	---	---
Alheira	2	---	---
Cambeses	4	---	---
Chorente	2	---	---
Courel	4	---	---
Fornelos	23	---	---
Gilmonde	22	---	---
Grimancelos	1	---	---
Lama-Barcelos	26	---	---
Lijó	28	---	---
Macieira de Rates	13	---	---
Negreiros	2	---	---
Oliveira	18	---	---
Paradela	4	---	---
Várzea	25	---	---
Vila Seca	4	---	---
Boticas	37	---	---
Covas de Barrosos	25	---	---
Curros	12	---	---
Braga	55	---	---
Ferreiros	17	---	---
Figueiredo	8	---	---
Seramil	30	---	---
Cinfães	25	---	---
Cinfães	23	---	---
São Cristovão de Nogueira	2	---	---
Felgueiras	31	---	---
Vila Cova da Lixa	31	---	---
Guimarães	24	---	---
Creixomil	1	---	---
Fermentões	2	---	---
Gondar	1	---	---
Ponte	2	---	---
Ronfe	3	---	---
Selho (São Lourenço)	5	---	---
Serzedelo	1	---	---
Silvares	6	---	---
Souto (São Salvador)	3	---	---
Macedo de Cavaleiros	122	---	---
Arcas	17	---	---

3.1. Soros analisados por freguesia e concelho na região NUTS 2 Norte (continuação).

NUTS2 NORTE			
Concelho	Total soros	Positivos	Prevalência (%)
Freguesias			
Macedo de Cavaleiros	122	---	---
Corujas	23	---	---
Lagoa	43	---	---
Macedo de Cavaleiros	6	---	---
Salselas	33	---	---
Matosinhos	39	---	---
Leça do Balio	18	---	---
São Mamede de Infesta	21	---	---
Mirandela	28	---	---
Mirandela	28	---	---
Mogadouro	156	---	---
Azinhoso	12	---	---
Castanheira	43	---	---
Peredo da Bemposta	20	---	---
Saldanha	81	---	---
Montalegre	284	18	6,3
Covelães	33	---	---
Outeiro	43	---	---
Padornelos	25	---	---
Pitões das Júnias	92	18	19,6
Viade de Baixo	75	---	---
Vila da Ponte	16	---	---
Oliveira de Azeméis	363	---	---
Fajões	28	---	---
Loureiro	156	---	---
São Martinho da Gândara	179	---	---
Paços de Ferreira	37	---	---
Arreigada	3	---	---
Ferreira	4	---	---
Frazão	12	---	---
Freamunde	12	---	---
Seroa	6	---	---
Penafiel	8	---	---
Croca	1	---	---
Duas Igrejas	1	---	---
Marecos	4	---	---
Paço de Sousa	2	---	---
Ponte de Lima	74	---	---
Ardegão	3	---	---
Correlhã	3	---	---
Gaifar	12	---	---
Gandra	1	---	---
Mato	3	---	---
Poiães	47	---	---
Refoios de Lima	5	---	---
Póvoa de Varzim	185	---	---
Balazar	140	---	---
Rates	45	---	---
Póvoa do Lanhoso	61	---	---
Campos	49	---	---
Garfe	1	---	---
Geraz do Minho	1	---	---
Louredo	10	---	---
Sabrosa	49	---	---
Gouvinhas	24	---	---
Torre do Pinhão	25	---	---

3.1. Soros analisados por freguesia e concelho na região NUTS 2 Norte (continuação).

NUTS2 NORTE			
Concelho	Total soros	Positivos	Prevalência (%)
Freguesia			
Santo Tirso	11	---	---
Areias	1	---	---
Lama-St Tirso	7	---	---
Roriz	3	---	---
Terras de Bouro	13	---	---
Choreense	12	---	---
Vilar Da Veiga	1	---	---
Trofa	22	---	---
Alvarelhos	11	---	---
Bougado (Santiago)	11	---	---
Valpaços	27	7	25,9
Bouçoães	14	7	50,0
Lebução	13	---	---
Vila do Conde	378	---	---
Árvore	57	---	---
Bagunte	173	---	---
Fajozes	54	---	---
Macieira da Maia	94	---	---
Vila Pouca de Aguiar	117	---	---
Soutelo de Aguiar	99	---	---
Vila Pouca de Aguiar	18	---	---
Vila Verde	93	---	---
Azões	10	---	---
Dossãos	19	---	---
Esqueiros	1	---	---
Goães-Vila Verde	28	---	---
Godinhaços	5	---	---
Lage	1	---	---
Loureira	1	---	---
Marrancos	1	---	---
Nevogilde	11	---	---
Pico	3	---	---
Portela das Cabras	4	---	---
Prado (São Miguel)	1	---	---
Rio Mau	6	---	---
Soutelo	1	---	---
Valbom (São Pedro)	1	---	---
Águeda	35	---	---
Préstimo	35	---	---

3.2. Soros analisados por freguesia e concelho na região NUTS 2 Centro.

NUTS2 CENTRO			
Concelho	Total soros	Positivos	Prevalência (%)
Freguesia			
Alcobaça	155	---	---
Alfeizeirão	155	---	---
Almeida	210	---	---
Azinhal	5	---	---
Freineda	12	---	---
Malpartida	112	---	---
São Pedro de Rio Seco	74	---	---
Vilar Formoso	7	---	---
Belmonte	19	---	---
Belmonte	19	---	---
Cantanhede	118	---	---
Outil	9	---	---
Sanguinheira	102	---	---
São Caetano	7	---	---
Castro Daire	11	---	---
Castro Daire	4	---	---
Gosende	7	---	---
Covilhã	13	---	---
Peraboa	13	---	---
Figueira da Foz	235	---	---
Alhadas	53	---	---
Ferreira-a-Nova	62	---	---
Maiorca	120	---	---
Figueira de Castelo Rodrigo	219	---	---
Reigada	37	---	---
Vilar de Amargo	74	---	---
Vilar Torpim	108	---	---
Guarda	172	---	---
Maçainhas	121	---	---
Rochoso	18	---	---
Vale de Estrela	21	---	---
Vila Fernando	12	---	---
Idanha-a-Nova	80	4	5,0
Idanha-a-Nova	21	---	---
Ladoeiro	39	---	---
Monfortinho	15	4	26,7
Zebreira	5	---	---
Meda	13	---	---
Prova	13	---	---
Mira	120	---	---
Carapelhos	51	---	---
Mira	69	---	---
Montemor-o-Velho	291	---	---
Arazede	181	---	---
Verride	110	---	---
Murtosa	7	---	---
Bunheiro	7	---	---
Pinhel	23	---	---
Freixedas	11	---	---
Santa Eufémia	12	---	---
Pombal	57	---	---
Louriçal	57	---	---
Porto de Mós	155	---	---
São Bento	155	---	---
S. Comba Dão	29	---	---
S. Comba Dão	29	---	---

3.2. Soros analisados por freguesia e concelho na região NUTS 2 Centro (continuação).

NUTS2 CENTRO			
Concelho	Total soros	Positivos	Prevalência (%)
Freguesia			
Sabugal	94	---	---
Aldeia da Ribeira	94	---	---
Tondela	7	---	---
Guardão	1	---	---
Mosteirinho	6	---	---
Trancoso	39	4	10,3
Rio de Mel	39	4	10,3
Vagos	69	---	---
Sosa	69	---	---
Vouzela	24	---	---
Cambra	2	---	---
Campia	16	---	---
Fornelo do Monte	2	---	---
Ventosa	4	---	---

3.3. Soros analisados por freguesia e concelho na região NUTS 2 Lisboa.

NUTS2 LISBOA			
Concelho	Total soros	Positivos	Prevalência (%)
Freguesia			
Lisboa	5	---	---
Carnide	5	---	---
Vila Franca de Xira	101	1	1,0
Alverca do Ribatejo	101	1	1,0

3.4. Soros analisados por freguesia e concelho na região NUTS 2 Alentejo

NUTS2 ALENTEJO				
Concelho		Total soros	Positivos	Prevalência (%)
	Freguesia			
Alandroal	Alandroal	187	---	---
	Santiago Maior	91	---	---
Alcácer do Sal	Alcácer do Sal	181	---	---
	Alcácer do Sal	181	---	---
Aljustrel	Aljustrel	13	---	---
	Aljustrel	13	---	---
Almodôvar	Almodôvar	203	---	---
	Almodôvar	163	---	---
	Gomes Aires	40	---	---
Alter do Chão	Alter do Chão	96	---	---
	Alter do Chão	96	---	---
Alvito	Alvito	99	---	---
	Vila Nova da Baronia	99	---	---
Arraiolos	Arraiolos	223	56	56
	Arraiolos	120	---	---
	Gafanhoeira	103	56	54,4
Beja	Beja	124	---	---
	São Brissos	124	---	---
Benavente	Benavente	350	10	10
	Benavente	120	---	---
	Samora Correia	120	10	8,3
	Santo Estevão	110	---	---
Borba	Borba	202	1	1
	Orada	72	1	1,4
	Rio de Moinhos	130	---	---
Castro Verde	Castro Verde	79	---	---
	Castro Verde	64	---	---
	Santa Bárbara	15	---	---
Chamusca	Chamusca	320	15	15
	Carregueira	60	15	25,0
	Chouto	110	---	---
	Parreira	150	---	---
Coruche	Coruche	314	1	1
	Biscaíno	243	1	0,4
	Coruche	71	---	---
Estremoz	Estremoz	192	39	39
	Évora Monte	110	---	---
	Veiros	82	39	47,6
Évora	Évora	698	60	60
	Nossa Senhora da Graça do Divor	147	1	0,7
	Nossa Senhora da Tourega	201	58	28,9
	Sé e São Pedro	240	1	0,4
	Torre de Coelheiros	110	---	---
Mértola	Mértola	230	---	---
	Mértola	120	---	---
	São Sebastião dos Carros	110	---	---
Montemor-o-Novo	Montemor-o-Novo	457	12	12
	Cabrela	285	9	3,2
	Santiago do Escoural	172	3	1,7
Mora	Mora	96	---	---
	Brotas	96	---	---
Mourão	Mourão	340	6	6
	Alandroal	46	5	10,9
	Granja	184	---	---

3.4. Soros analisados por freguesia e concelho na região NUTS 2 Alentejo (continuação)

NUTS2 ALENTEJO			
Concelho	Total soros	Positivos	Prevalência (%)
Freguesia			
Mourão	340	6	6
Mourão	110	1	0,9
Odemira	403	---	---
São Luis	148	---	---
São Teotónio	140	---	---
Vila Nova de Milfontes	115	---	---
Ourique	110	---	---
Garvão	110	---	---
Portel	150	---	---
Monte do Trigo	150	---	---
Redondo	110	47	47
Redondo	110	47	42,7
Reguengos de Monsaraz	349	71	71
Campo	208	71	34,1
Reguengos de Monsaraz	141	---	---
Serpa	333	---	---
Brinches	94	---	---
Serpa (Salvador)	105	---	---
Serpa (Santa Maria)	110	---	---
Vila Nova de São Bento	24	---	---
Sousel	314	---	---
Casa Branca	151	---	---
Sousel	163	---	---
Vila Viçosa	110	3	3
Ciladas	110	3	2,7

3.5. Soros analisados por freguesia e concelho na região NUTS 2 Algarve

NUTS2 ALGARVE			
Concelho	Total soros	Positivos	Prevalência (%)
Freguesia			
Aljezur	198	---	---
Aljezur	74	---	---
Bordeira	3	---	---
Odeceixe	32	---	---
Rogil	89	---	---

Anexo 4

Questionário besnoitiose bovina I



1. Em média, quantas explorações com besnoitiose bovina observa por ano?

Check all that apply.

- mais de 4 explorações
 2-4 explorações
 1 ou menos explorações

2. Em que meses observa os casos de besnoitiose bovina?

Classifique de 0 a 3 (0 ausente, 1 pouco frequente, 3 muito frequente)

Mark only one oval per row.

	0	1	2	3
Jan-Mar	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Abr-Jun	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Jul-Set	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Out-Dez	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

3. Alguma vez detectou os animais na fase aguda da doença?

Mark only one oval.

- Sim
 Não (continue no ponto 5)

4. Fase aguda

Na listagem seguinte encontra-se um conjunto de sinais clínicos associados à fase aguda da besnoitiose bovina. Classifique de 0 a 3 (0 ausente, 1 pouco frequente, 3 muito frequente).

Mark only one oval per row.

	0	1	2	3
Hipertermia	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Anorexia	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
↑ frequência cardíaca e respiratória	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Fotofobia	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Corrimento nasal e ocular seroso	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Decúbito prolongado	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Locomoção lenta	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Congestão das mucosas	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Edemas	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Linfadenopatia superficial	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Orquite	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

5. Fase crónica

Na listagem seguinte encontra-se um conjunto de sinais clínicos associados à fase crónica da besnoitiose bovina. Classifique de 0 a 3 (0 ausente, 1 pouco frequente, 3 muito frequente).

Mark only one oval per row.

	0	1	2	3
Espessamento e pregueamento da pele	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Alopécia e hiperqueratose	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Seborreia	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Fissuras entre as pregas de pele	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Linfadenopatia superficial	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Hipertermia ligeira	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Anorexia e emaciação	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Quistos na conjuntiva da esclera/ mucosa nasal/ vulvar	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Corrimento nasal mucopurulento	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Atrofia testicular uni ou bilateral	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Infertilidade nos machos	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

6. Que métodos utiliza para o diagnóstico da besnoitiose bovina?

Mark only one oval.

- Apenas diagnóstico sintomático (continue no ponto 8)
- Diagnóstico sintomático e confirmação laboratorial

7. Qual foi a técnica de diagnóstico laboratorial utilizada?

Check all that apply.

- Histopatologia
- Imunofluorescência Indirecta
- ELISA
- Western blot
- Não me recordo
- Other:

8. Instituiu algum tratamento?

Mark only one oval.

- Sim
- Não (continue no ponto 11)

9. O tratamento teve sucesso?

Check all that apply.

Sim

Não

10. Comentários:

.....

11. Instituiu algumas medidas preventivas?

Mark only one oval.

Sim

Não (continue no ponto 13)

12. Que medidas tomou?

Check all that apply.

Refugio dos animais doentes

Refugio dos animais serologicamente positivos

Separação dos animais infectados

Reforço dos tratamentos insecticidas

Rastreio serológico dos animais adquiridos

Other:

Dados epidemiológicos 2013

13. Diagnosticou animais com besnoitiose bovina em 2013?

Mark only one oval.

Sim

Não (continue no ponto)

14. Em que concelhos observou animais com besnoitiose bovina?

.....

.....

.....

.....

.....

Em quantas explorações observou a infecção?

Mark only one oval.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

16. Quantos bovinos foram intervencionados por si (número aproximado)?

.....

17. Nas explorações infectadas, quantos animais apresentaram manifestações clínicas de besnoitiose bovina ?

Mark only one oval per row.

	1-2	3-5	5-10	>10
Exploração 1	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Exploração 2	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Exploração 3	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Exploração 4	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

18. Comentários:

.....

19. Nas explorações infectadas, quantos animais morreram devido a besnoitiose bovina?

Mark only one oval per row.

	0	1-2	3-5	>5
Exploração 1	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Exploração 2	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Exploração 3	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Exploração 4	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

20. Comentários:

.....

21. Em que concelhos diagnosticou explorações com besnoitiose bovina anteriormente a 2013?

.....

.....

.....

.....

.....

Qual é o impacto económico que atribui à besnoitiose bovina?

Classifique de 1 a 4 (1 pouco importante, 4 muito importante)

Mark only one oval.

1	2	3	4
<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

23. Qual é a sua área de intervenção?

Check all that apply.

- Aveiro
- Beja
- Braga
- Bragança
- Castelo Branco
- Coimbra
- Évora
- Faro
- Leiria
- Lisboa
- Portalegre
- Porto
- Santarém
- Setúbal
- Viana do Castelo
- Vila Real
- Viseu
- Guarda
- Região Autónoma dos Açores
- Região Autónoma da Madeira

24. Ilhas das regiões autónomas:

.....

Questionário besnoitiose bovina II

Conhece a besnoitiose bovina?

1. *Mark only one oval.*

- Conheço mas nunca vi
- Nunca ouvi falar

O que é a besnoitiose bovina?

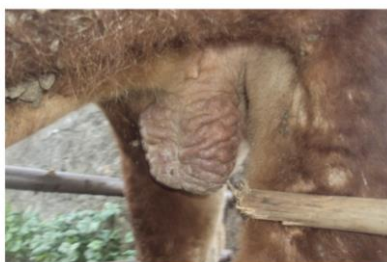
A besnoitiose bovina é uma doença dos bovinos provocada por *Besnoitia besnoiti*, um protozoário apicomplexa do grupo das coccídias formadoras de quistos.

A doença caracteriza-se por um quadro de patologia cutânea e está associada a infertilidade nos machos. As imagens seguintes mostram algumas das manifestações clínicas tipicamente associadas às formas mais severas da besnoitiose bovina. Embora no campo predominem as formas subclínicas, a doença pode afectar até cerca de 10% dos animais numa exploração. A besnoitiose bovina provoca perdas produtivas, infertilidade nos machos, as peles ficam inutilizadas e pode levar à morte do animal. Trata-se de uma doença sub-diagnosticada, sendo frequentemente confundida com outras afecções cutâneas, especialmente a sarna. A besnoitiose bovina não tem tratamento.

Esclerodermia, pregueamento e fissuras na pele



Corrimento nasal e ocular mucopurulento, atrofia testicular



2. Poderá ter observado animais com sinais clínicos sugestivos de besnoitose bovina nos últimos 5 anos?

Deverão ser considerados apenas os animais em que não foi possível apurar a etiologia.

Mark only one oval.

- Sim (prossiga com o questionário)
- Não (indique a sua área de intervenção no ponto 18)

3. Nas explorações onde observou animais com sinais clínicos compatíveis com besnoitose registou:

Mark only one oval.

- Apenas sinais cutâneos
- Apenas infertilidade nos machos
- Sinais cutâneos e infertilidade nos machos
- Sinais cutâneos numas explorações e infertilidade noutras

4. Observou alguma(s) das seguintes manifestações cutâneas?

Na listagem encontra-se um conjunto de sinais cutâneos associados à fase crónica da besnoitose bovina. Classifique de 0 a 3 (0 ausente, 1 pouco frequente, 3 muito frequente).

Mark only one oval per row.

	0	1	2	3
Espeçamento e pregueamento da pele	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Alopécia e hiperqueratose	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Seborreia	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Quistos na conjuntiva da esclera/mucosa nasal/vulvar	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

5. A que outras doenças associou as manifestações cutâneas?

Check all that apply.

- Sarna
- Tinha
- Agentes tóxicos
- Carências minerais
- Indeterminado
- Other:

6. A gravidade dos sintomas justificou a morte de algum destes animais?

Check all that apply.

- Sim
- Não

7. No geral, em que meses do ano observa estes sinais?

Classifique de 0 a 3 (0 ausente, 1 pouco frequente, 3 muito frequente)

Mark only one oval per row.

	0	1	2	3
Jan-Mar	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Abr-Jun	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Jul-Set	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Out-Nov	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

8. Observou algum(s) dos seguintes sinais do aparelho reprodutor?

Na listagem encontra-se um conjunto de sinais do aparelho reprodutor associados à fase crónica da besnoitiose bovina. Classifique de 0 a 3 (0 ausente, 1 pouco frequente, 3 muito frequente).

Mark only one oval per row.

	0	1	2	3
Orquite	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Atrofia testicular	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Infertilidade nos machos	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

9. A que outras doenças associou os sinais do aparelho reprodutor observados?

Classifique de 0 a 3 (0 ausente, 1 pouco frequente, 3 muito frequente).

Check all that apply.

- IBR
- BVD
- Brucelose
- Causas não infecciosas
- Other:

10. No geral, em que meses do ano observa estes sinais?

Classifique de 0 a 3 (0 ausente, 1 pouco frequente, 3 muito frequente)

Mark only one oval per row.

	0	1	2	3
Jan-Mar	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Abr-Jun	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Jul-Set	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Out-Nov	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Dados epidemiológicos 2013

11. Em 2013 observou animais com sintomas sugestivos de besnoitiose bovina?

Mark only one oval.

- Sim
 Não (indique a sua área de intervenção no ponto 18)

12. Refira os concelhos onde detectou animais com sinais clínicos compatíveis com besnoitiose bovina

.....
.....
.....
.....

Em quantas explorações observou animais com estes sinais?

Mark only one oval.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

14. Comentários:

.....

15. Quantos animais afectados observou nas explorações?

Mark only one oval per row.

	1-2	3-5	>5
Exploração 1	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Exploração 2	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Exploração 3	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

16. Comentários:

.....

17. Nos últimos 5 anos, em que concelhos poderá ter observado animais com sinais clínicos sugestivos de besnoitiose bovina ?

18. Qual é a sua Área de Intervenção?

Check all that apply.

- Aveiro
- Beja
- Braga
- Castelo Branco
- Coimbra
- Évora
- Faro
- Guarda
- Leiria
- Lisboa
- Portalegre
- Porto
- Santarém
- Setúbal
- Viana do Castelo
- Vila Real
- Viseu
- Bragança
- Região Autónoma dos Açores
- Região Autónoma da Madeira

19. Ilhas das regiões autónomas:

FIM do Questionário

Muito obrigada pela sua colaboração.

Para qualquer esclarecimento adicional contacte:

Yolanda Vaz: yvaz@fmv.ulisboa.pt

Helder Cortes: hcec@uevora.pt

Helga Waap: helga.waap@iniav.pt; Tl.: 217115231

20. Comentários

21. Identificação e contacto do Médico Veterinário (facultativo)

Indique o seu nome e telefone, se desejar ser contactado(a) relativamente a assuntos relacionados com a besnoitiose bovina.

Powered by
 Google Drive