



Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Relatório de Estágio

**Clínica e Cirurgia de espécies pecuárias - Pesquisa de
agentes transmitidos por ixodídeos em bovinos
assintomáticos da Ilha de São Miguel, Açores**

Maria Martins de Almeida Felício

Orientador(es) | Ricardo Jorge Romão
Pedro Miguel Cunha Reis
Rui Jorge Batista Martelo

Évora 2021



Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Relatório de Estágio

**Clínica e Cirurgia de espécies pecuárias - Pesquisa de
agentes transmitidos por ixodídeos em bovinos
assintomáticos da Ilha de São Miguel, Açores**

Maria Martins de Almeida Felício

Orientador(es) | Ricardo Jorge Romão

Pedro Miguel Cunha Reis

Rui Jorge Batista Martelo

Évora 2021



O relatório de estágio foi objeto de apreciação e discussão pública pelo seguinte júri nomeado pelo Diretor da Escola de Ciências e Tecnologia:

Presidente | Margarida Simões (Universidade de Évora)

Vogais | Helder Carola Cortes (Universidade de Évora) (Arguente)
Ricardo Jorge Romão (Universidade de Évora) (Orientador)

Agradecimentos

Ao professor Ricardo Romão, por ter aceite ser meu orientador e, por todo o apoio ao longo do estágio e da realização deste trabalho.

À professora Ludovina, por toda a disponibilidade e ajuda, não só durante este trabalho, mas também durante os cinco anos do curso.

À Dra. Sara Zúquete, por toda a ajuda no trabalho laboratorial e pela amizade demonstrada.

Ao Dr. Pedro Reis, meu orientador externo, que me recebeu da melhor forma na ilha de São Miguel e na Associação Agrícola de São Miguel, por todos os ensinamentos, partilhas e momentos de lazer e turismo. À restante equipa: o Dr. João Vidal, o Dr. Francisco Lopes, o Dr. Jorge Medeiros e o Dr. Hélder Dinis, por toda a confiança demonstrada.

Ao Dr. Rui Martelo, meu orientador externo, na VetAI, pelos ensinamentos transmitidos. À restante equipa: Dra. Alexandra Romão, Dra. Teresa Capitão, Dra. Inês Batista, às enfermeiras Elisa Prazeres, Raquel Pereira e Patrícia Peralta, por toda a ajuda na minha integração. À Joana, pela companhia em Portalegre.

Aos meus pais e à minha irmã pelo apoio ao longo deste percurso; em especial à minha mãe por todas as “perguntas” ao longo de toda a minha vida escolar.

Aos meus amigos de todas as horas: a Marina, o César, a Maria Francisca, a Sandy e a Patrícia.

À minha família académica: o Ricardo, o André e o Rafael.

Aos meus amigos agrónomos, por me ensinarem que a vida académica é mais além de estudar.

Ao André e à Mafalda, pela amizade ao longo dos cinco anos e, principalmente, pela ajuda na minha vida insular.

À Joana Coimbra, por toda a amizade e por acreditar sempre em mim.

Ao Ivo, por todo o apoio, amizade e compreensão.

A todos, o meu Agradecimento!

Resumo

O presente relatório de estágio foi desenvolvido no âmbito do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária da Universidade de Évora.

O relatório de estágio encontra-se dividido em três componentes principais. Na primeira aborda-se a casuística observada ao longo do estágio curricular, na segunda uma breve revisão bibliográfica sobre o tema “Agentes transmitidos por carraças causadores de doença em bovinos: *Anaplasma* spp., *Babesia* spp., *Ehrlichia* spp. e *Theileria* spp.”, e na última a descrição e discussão da pesquisa destes agentes em bovinos assintomáticos na ilha de São Miguel, Açores. Do nosso conhecimento, a presente pesquisa permite-nos fazer a primeira referência a agentes transmitidos por ixodídeos a bovinos no Arquipélago dos Açores, nomeadamente: *Theileria orientalis* e *Anaplasma bovis*; e a primeira referência a *Anaplasma bovis* em Portugal.

Palavras-chave: bovino; clínica; hemoparasitas; *Theileria orientalis*; *Anaplasma bovis*

Clinic and Surgery in livestock species - Research of agents transmitted by ixodids in asymptomatic cattle from São Miguel Island, Azores

Abstract

The present report was developed in the context of Integrated Master's Degree in Veterinary Medicine from the University of Évora.

This report is divided into three main parts. The first one focuses on the clinical cases and the activities developed throughout the period of the internship, whereas the second constitutes a brief literature review on “Agents transmitted by disease-causing ticks in cattle: *Anaplasma* spp., *Babesia* spp., *Ehrlichia* spp. and *Theileria* spp.”. The last one pertains to the description and discussion of the research on these agents in asymptomatic cattle from the São Miguel Island, in the Azores. To our knowledge, the present research is the first reference to agents transmitted by ixodids to cattle in the Azores archipelago, namely: *Theileria orientalis* and *Anaplasma bovis*. It is also the first reference to *Anaplasma bovis* in Portugal.

Keywords: cattle; clinical; hemoparasite; *Theileria orientalis*, *Anaplasma bovis*

Índice Geral

| | |
|--|----|
| 1. Introdução | 1 |
| 2. Relatório de estágio..... | 2 |
| 2.1 Local de Estágio | 2 |
| 2.2 Casuística..... | 3 |
| 2.2.1 Medicina preventiva..... | 4 |
| 2.2.1.1 Rastreio Oficial | 6 |
| 2.2.1.2 Profilaxia Facultativa..... | 8 |
| 2.2.2 Clínica médica | 10 |
| 2.2.2.1. Sistema Respiratório | 11 |
| 2.2.2.2. Sistema Digestivo | 13 |
| 2.2.2.3. Sistema Reprodutor..... | 17 |
| 2.2.2.4. Glândula mamária | 19 |
| 2.2.2.4.1. Avaliação de ordenha | 22 |
| 2.2.2.5. Sistema Metabólico | 25 |
| 2.2.2.6. Sistema Musculoesquelético | 27 |
| 2.2.2.7. Pele e Anexos..... | 29 |
| 2.2.2.8. Outros..... | 31 |
| 2.2.3. Clínica Cirúrgica | 32 |
| 2.2.4. Exames de diagnóstico..... | 37 |
| 2.2.5. Controlo reprodutivo | 38 |
| 2.2.6. Clínica de equídeos..... | 41 |
| 2.2.7. Exame inicial em montarias..... | 42 |
| 3. Revisão bibliográfica: Agentes transmitidos por carraças causadores de doença em bovinos: <i>Anaplasma spp.</i> , <i>Babesia spp.</i> , <i>Ehrlichia spp.</i> e <i>Theileria spp.</i> | 43 |
| 3.1. Introdução..... | 43 |
| 3.2. Agentes patogénicos | 43 |
| 3.2.1. <i>Babesia spp.</i> | 43 |
| 3.2.1.1. Ciclo de Vida e transmissão | 45 |
| 3.2.1.2. Resposta imunitária e sinais clínicos | 47 |
| 3.2.2. <i>Theileria spp.</i> | 49 |
| 3.2.2.1. Ciclo de vida e transmissão | 50 |
| 3.2.2.2. Resposta Imunitária e sinais clínicos..... | 52 |
| 3.2.3. <i>Anaplasma spp.</i> | 54 |
| 3.2.3.1. Ciclo de vida e transmissão..... | 55 |
| 3.2.3.2. Resposta Imunitária e sinais Clínicos | 57 |
| 3.2.4. <i>Ehrlichia spp.</i> | 58 |
| 3.2.4.1. Ciclo de vida e transmissão..... | 59 |
| 3.2.4.2. Resposta Imunitária e sinais clínicos..... | 60 |
| 3.3. Lesões <i>post mortem</i> | 61 |

| | | |
|----------|---|----|
| 3.4. | Diagnósticos Diferenciais | 63 |
| 3.5. | Diagnóstico..... | 64 |
| 3.5.1. | Identificação do organismo..... | 65 |
| 3.5.1.1. | Observação microscópica..... | 65 |
| 3.5.1.2. | Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) | 65 |
| 3.5.1.3. | Subinoculação | 66 |
| 3.5.1.4. | Cultura <i>in vitro</i> | 66 |
| 3.5.2. | Métodos serológicos..... | 66 |
| 3.5.2.1. | Teste Indireto de Fluorescência de Anticorpos (IFAT)..... | 66 |
| 3.5.2.2. | Ensaio de Imunoabsorção enzimática (ELISA)..... | 67 |
| 3.5.2.3. | Teste de Fixação do Complemento (CFT)..... | 67 |
| 3.5.2.4. | Teste de Aglutinação em Cartão (CAT)..... | 67 |
| 3.5.2.5. | Imunocromatografia (ICT)..... | 67 |
| 3.6. | Controlo | 68 |
| 3.6.1. | Manutenção dos efetivos livres de infeção | 69 |
| 3.6.2. | Acaricidas | 69 |
| 3.6.3. | Administração profilática de antibióticos..... | 70 |
| 3.6.4. | Controlo mecânico..... | 70 |
| 3.6.5. | Estabilidade Endémica Natural..... | 70 |
| 3.6.6. | Vacinas..... | 71 |
| 3.7. | Tratamento | 73 |
| 3.7.1. | Fármacos para tratamento de babesiose | 74 |
| 3.7.2. | Fármacos para o tratamento de theileriose | 74 |
| 3.7.3. | Fármacos para o tratamento de anaplasmosose | 75 |
| 3.7.4. | Fármacos para o tratamento de erliquiose | 75 |
| 3.8. | Perdas económicas..... | 75 |
| 4. | Pesquisa de agentes transmitidos por ixodídeos em bovinos assintomáticos na ilha de São Miguel, Açores..... | 77 |
| 4.1. | Introdução..... | 77 |
| 4.2. | Material e Métodos: | 77 |
| 4.2.1. | Explorações: | 77 |
| 4.2.2. | Amostragem | 78 |
| 4.2.3. | Inquérito epidemiológico..... | 79 |
| 4.2.4. | Deteção molecular de organismos | 80 |
| 4.2.5. | Deteção microscópica de organismos..... | 82 |
| 4.3. | Resultados..... | 83 |
| 4.3.1. | Inquérito epidemiológico..... | 83 |
| 4.3.2. | Pesquisa Molecular | 85 |
| 4.3.3. | Sequenciação Genómica..... | 85 |
| 4.3.4. | Observação microscópica | 87 |
| 4.4. | Discussão | 88 |

| | |
|--|-----|
| 4.5. Conclusão..... | 96 |
| 5. Considerações Finais | 96 |
| 6. Referências bibliográficas | 97 |
| Anexo I – Inquérito epidemiológico ao produtor | 113 |
| Anexo II – Resultados existentes da pesquisa molecular de amostras individuais | 114 |

Índice de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1: Vitelo em caixa de madeira individual. | 6 |
| Figura 2: Vitelo em compartimento de cimento | 6 |
| Figura 3: Ovelhas em manga de contenção..... | 6 |
| Figura 4: Medição com cutímetro de reação positiva no local de inoculação da tuberculina mamífera. | 7 |
| Figura 5: Reação positiva no local de inoculação da tuberculina mamífera..... | 7 |
| Figura 6: Teste rápido para diarreias positivo a <i>Cryptosporidium</i> sp..... | 15 |
| Figura 7: Realização de exame físico em vitelo com diarreia. | 15 |
| Figura 8: Vaca com diarreia aquosa e profusa..... | 16 |
| Figura 9: Vaca com edema submandibular | 16 |
| Figura 10: Leite de mastite clínica..... | 20 |
| Figura 11: Leite de mastite clínica hemolítica..... | 20 |
| Figura 12: Edema ventral devido a mastite provocada por <i>Escherichia coli</i> | 20 |
| Figura 13: Sala de ordenha fixa. | 23 |
| Figura 14: Máquina de ordenha móvel..... | 23 |
| Figura 15: Escala de pontuação da higiene do úbere (Adaptado de Ruegg, 2002). | 23 |
| Figura 16: Escala de pontuação da limpeza da ponta do teto (Adaptado de WestfaliaSurge, 2006)..... | 24 |
| Figura 17: Escala de pontuação do grau de hiperqueratose do teto (Adaptado de Mein et al., 2001.) | 24 |
| Figura 18: Limpeza da ponta do teto utilizando álcool etílico a 96%. | 25 |
| Figura 19: Recolha asséptica de amostra de leite..... | 25 |
| Figura 20: Teste de sensibilidade aos antibióticos. | 25 |
| Figura 21: Vaca caída com hipocalcemia..... | 26 |
| Figura 22: Fitas para medição de corpos cetônicos no leite. | 27 |
| Figura 23: Vaca caída com lesão dos nervos ciático e obturador. | 29 |
| Figura 24: Lesão de fotossensibilização secundária. | 30 |
| Figura 25: Fibropapilomas cutâneos no membro anterior direito de vitelo. | 31 |
| Figura 26: Cicatriz na córnea de queratoconjuntivite infecciosa bovina. | 32 |
| Figura 27: Abomasopexia pelo lado esquerdo utilizando o método de Utrecht (Adaptado de Weaver et al., 2018). | 34 |
| Figura 28: Técnica cirúrgica em DAE. A - Limpeza utilizando sabão; B - Tricotomia; C - Anestesia local (L invertido); D - Corte; E - Visualização do abomaso (seta amarela); F - Fixação do abomaso; G - Nó após fixação de abomaso; H - Sutura das camadas internas; I – Sutura da pele. | 36 |

| | |
|---|----|
| Figura 29: Descorna em vitelo utilizando termocautério..... | 36 |
| Figura 30: Lesão traumática em corno de touro charolês. | 36 |
| Figura 31: Vaca com prolapso vaginal. | 37 |
| Figura 32: Vaca com prolapso uterino..... | 37 |
| Figura 33: Sutura de Buhner. | 37 |
| Figura 34: Lesão compatível com tuberculose em linfonodo mesentérico de veado. | 42 |
| Figura 35: A – Babesia bigemina em eritrócitos de bovino, (Adaptado de Mosqueda et al., 2012); B - Babesia bovis eritrócitos de bovino, (Adaptado de Mosqueda et al., 2012); C - Babesia divergens em eritrócitos de humano, (Adaptado de Yabsley & Shock, 2013); D – Babesia major em eritrócitos de bovino corados pelo método de Giemsa, x 1000, (Adaptado de Taylor et al., 2016). | 45 |
| Figura 36: Ciclo de vida de Babesia bovis (Adaptado de Marcelino et al., 2012)..... | 46 |
| Figura 37: A - Esfregaço de sangue com formas anelares de piroplasmas de Theileria annulata nos eritrócitos de bovino, corado pelo método de Giemsa, x 1000, (Adaptado de Branco et al., 2010); B - Esfregaço de linfonodo mostrando um esquizonte (corpo azul de Koch) de Theileria annulata numa célula mononuclear de bovino, corado pelo método de Giemsa, x 1000, (Adaptado de Branco et al., 2010); C – Forma intraeritrocitária de Theileria parva em bovino, corado pelo método de Giemsa, x 1000, (Adaptado de Taylor et al., 2016); D – Esfregaço de sangue com forma intraeritrocitária de Theileria orientalis, em bovino, corado pelo método de Giemsa, x1000, (Adaptado de Kakati et al., 2015). | 50 |
| Figura 38: Ciclo de vida de Theileria parva (Adaptado de Marcelino et al., 2012). | 52 |
| Figura 39: A - Anaplasma marginale (setas) em eritrócitos de bovinos (Adaptado de Nicholson et al., 2019); B – Inclusões de Anaplasma bovis em monócitos de ovino (Adaptado de Liu et al., 2012); C – Mórdulas de Anaplasma phagocytophilum em neutrófilo de equino, coloração de Wright-Giemsa, x 100 (Adaptado de Uehlinger et al., 2011). | 55 |
| Figura 40: Ciclo de vida de Anaplasma marginale (Adaptado de Marcelino et al., 2012). | 57 |
| Figura 41: A - Neutrófilo de caprino com Ehrlichia ruminantium; B – Célula endotelial em esfregaço cerebral de caprino contendo mórula de Ehrlichia ruminantium (Adaptado de http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/disease-images.php?name=heartwater&lang=en). ... | 59 |
| Figura 42: Ciclo de vida de Ehrlichia ruminantium (Adaptado de Marcelino et al., 2012)..... | 60 |
| Figura 43: Mapa da ilha de São Miguel com a distribuição das explorações (letras de A - J) inseridas no estudo, efetuado com recurso ao programa informático ArcGIS Desktop 10.6®.... | 78 |
| Figura 44: Esfregaço sanguíneo por arrastamento (Adaptado de https://kasvi.com.br/esfregaco-de-sangue-hematologia/). | 78 |
| Figura 45: Eletroforese pools para pesquisa de Babesia spp. e Theileria spp.. E1: Todas as amostras da exploração E ; EF2: Todas as amostras par (2, 4, 6, 8 e 10) das explorações E e F ; EF3: Todas as amostras ímpar (1, 3, 5, 7, 9) das explorações E e F ; F4: Todas as amostras das explorações F ; G1: Todas as amostras da exploração G ; GH2: Todas as amostras par (2, 4, 6, 8 e 10) das explorações G e H ; GH3: Todas as amostras ímpar (1, 3, 5, 7, 9) das explorações G e H ; H4: Todas as amostras das explorações H . +: Controlo positivo; - : Controlo negativo..... | 81 |
| Figura 46: Eletroforese amostras individuais para pesquisa de Babesia spp. e Theileria spp. animais 4, 7, 8, 9 e 10 da exploração I e animais 1, 3, 5, 7, 8 e 9 da exploração J . +: Controlo positivo; - : Controlo negativo..... | 81 |
| Figura 47: Formas intraeritrocitárias (seta preta) compatíveis com Theileria orientalis, amostra: A - E5 ; B – F7 (esfregaços corados com o método de Giemsa, ampliação de 1000 x). | 87 |
| Figura 48: Forma intramonocitária (seta preta) compatível com Anaplasma bovis, amostra F1 (esfregaços corados com o método de Giemsa, ampliação de 1000 x)..... | 88 |

Índice de gráficos

| | |
|--|----|
| Gráfico 1: Distribuição da casuística observada em bovinos por área de intervenção na componente AASM-CUA, em frequência absoluta e relativa (%), (n = 769). | 4 |
| Gráfico 2: Distribuição da casuística observada nas diferentes espécies por área de intervenção na componente VetAI, em frequência absoluta e relativa (%), (n = 20081). | 4 |
| Gráfico 3: Distribuição dos números de animais intervencionados, por espécie, na componente VetAI, em frequência absoluta e relativa (%), (n = 8823). | 4 |
| Gráfico 4: Distribuição da casuística observada na área da clínica médica na AASM-CUA e na VetAI, em frequência absoluta e relativa (%), (n = 362). | 10 |
| Gráfico 5: Número de animais por classe etária (em anos) | 79 |

Índice de tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Distribuição das intervenções de profilaxia e medicina preventiva, consoante o local de estágio e espécie, em frequência absoluta (Fa) e relativa (Fr) (%), (n = 19560). | 5 |
| Tabela 2: Tabela resumo das vacinas utilizadas para imunização contra agentes infecciosos. | 9 |
| Tabela 3: Distribuição dos casos de clínica médica referentes ao sistema respiratório, consoante local de estágio e espécie, em frequência absoluta (Fa) e relativa (Fr) (%)(n = 68). 11 | |
| Tabela 4: Distribuição dos casos de clínica médica referentes ao sistema digestivo, consoante local de estágio e espécie, em frequência absoluta (Fa) e relativa (Fr) (%) (n = 91). | 13 |
| Tabela 5: Agentes, idade em que são mais prováveis e tipo de diarreia neonatal (Adaptado de Stilwell, 2013). | 14 |
| Tabela 6: Distribuição dos casos de clínica médica referentes ao sistema reprodutor, consoante local de estágio e espécie, em frequência absoluta (Fa) e relativa (Fr) (%) (n = 68). | 17 |
| Tabela 7: Distribuição dos casos de clínica médica referentes a afeções da glândula mamária, consoante local de estágio e espécie, em frequência absoluta (Fa) e relativa (Fr) (%)(n = 38). 19 | |
| Tabela 8: Agentes causadores de mastite (Adaptado de Blowey & Edmondson, 2010). | 21 |
| Tabela 9: Distribuição das intervenções efetuadas durante avaliações de ordenha, na AASM-CUA, em frequência absoluta (Fa) e relativa (Fr) (%) (n = 78). | 22 |
| Tabela 10: Distribuição dos casos de clínica médica referentes ao sistema metabólico, consoante local de estágio e espécie, em frequência absoluta (Fa) e relativa (Fr) (%)(n = 24). 26 | |
| Tabela 11: Distribuição dos casos de clínica médica referentes ao sistema musculoesquelético, consoante local de estágio e espécie, em frequência absoluta (Fa) e relativa (Fr) (%)(n = 37). 28 | |
| Tabela 12: Distribuição dos casos de clínica médica referentes a afeções da pele e anexos, consoante local de estágio e espécie, em frequência absoluta (Fa) e relativa (Fr) (%)(n = 10). 30 | |
| Tabela 13: Distribuição dos casos clínicos de outros sistemas, consoante local de estágio e espécie, em frequência absoluta (Fa) e relativa (Fr) (%) (n = 26). | 31 |
| Tabela 14: Distribuição dos casos de clínica cirúrgica, consoante local de estágio e espécie, em frequência absoluta (Fa) e relativa (Fr) (%) (n = 59). | 33 |
| Tabela 15: Distribuição dos exames de diagnóstico, efetuados na VetAI, consoante espécie, em frequência absoluta (Fa) e relativa (Fr) (%) (n = 15) | 37 |
| Tabela 16: Distribuição das intervenções de controlo reprodutivo, consoante local de estágio e espécie, em frequência absoluta (Fa) e relativa (Fr) (%) (n = 873). | 39 |
| Tabela 17: Diagnóstico de gestação em bovinos por palpação retal (Adaptado de Hafez & Hafez, 2000). | 40 |

| | |
|--|-----|
| Tabela 18: Distribuição das intervenções e diagnósticos efetuados na clínica de equídeos, consoante local de estágio e espécie, em frequência absoluta (Fa) e relativa (Fr) (%)(n = 85). | 41 |
| Tabela 19: Espécies pertencentes ao género Babesia que infetam bovinos e respetivos vetores; as espécies a negrito estão reportadas em Portugal. (Adaptado de Silva et al., 2010; Gomes et al., 2013; Taylor et al., 2016; Constable et al., 2017; Staniec et al., 2018). | 44 |
| Tabela 20: Espécies pertencentes ao género Theileria que infetam bovinos e respetivos vetores; as espécies a negrito estão reportadas em Portugal. (Adaptado de Branco et al., 2010; Gomes et al., 2013; Stilwell, 2013; Mans et al., 2015; Taylor et al., 2016; Constable et al., 2017; Spickler, 2019). | 49 |
| Tabela 21: Espécies pertencentes ao género Anaplasma que infetam bovinos e respetivos vetores. (Adaptado de Rymaszewska & Grenda,2008; Taylor et al., 2016; Dugat et al., 2017). | 54 |
| Tabela 22: Espécies pertencentes ao género Ehrlichia que infetam bovinos e respetivos vetores. (Adaptado de Taylor et al., 2016; Cabezas-Cruz et al., 2019; Li et al., 2019). | 58 |
| Tabela 23: Lesões post mortem de babesiose, theileriose, anaplasmosse e erliquiose bovina (Adaptado de Taylor et al., 2016; Constable et al., 2017; Gharbi et al., 2017; Spickler, 2018; Spickler, 2019). | 62 |
| Tabela 24: Diagnósticos diferenciais de babesiose, theileriose, anaplasmosse e erliquiose bovina (Adaptado de Taylor et al., 2016; Constable et al., 2017). | 63 |
| Tabela 25: Métodos de diagnóstico de Babesia spp., Theileria spp. e Anaplasma spp. bovinas e a sua finalidade (Adaptado de OIE, 2019). | 68 |
| Tabela 26: Principais vacinas contra agentes transmitidos por carraças em bovinos (Adaptado de Marcelino et al., 2012; Constable et al., 2017). | 71 |
| Tabela 27: Número de amostras recolhidas por exploração. | 79 |
| Tabela 28: Média de idades, em anos, por exploração. | 79 |
| Tabela 29: Caracterização da exploração quanto ao efetivo, modo de produção e origem dos animais. | 83 |
| Tabela 30: Protocolo de desparasitação por exploração e visualização de carraças. | 84 |
| Tabela 31: Resultados sobre a presença de outros animais em contacto com bovinos, administração de fármacos pelo proprietário, bem como o número de vezes que utilizavam a mesma agulha, sobre a presença de animais com hemoglobinúria e sobre a presença de animais diagnosticados com leptospirose no efetivo. | 84 |
| Tabela 32: Resultados do PCR dos pools para pesquisa de Babesia spp. e Theileria spp e Anaplasma spp. e Ehrlichia spp. Total – amostras 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10 de cada exploração; Pares – amostras 2,4,6,8,10 de duas explorações; Ímpares – amostras 1,3,5,7,9 de duas explorações; Vermelho e “-“ – Resultado negativo; Verde e “+” – Resultado positivo. | 85 |
| Tabela 33: Resultados do PCR individual para pesquisa de Babesia spp. e Theileria spp e Anaplasma spp. e Ehrlichia spp. | 114 |
| Tabela 34: Resultados da sequenciação genómica de amostras positivas para Theileria orientalis. | 114 |

Índice de diagramas

| | |
|--|----|
| Diagrama 1: Taxonomia de Babesia spp. (Adaptado de Taylor et al., 2016). | 44 |
| Diagrama 2: Taxonomia de Theileria spp. (Adaptado de Taylor et al., 2016). | 49 |
| Diagrama 3: Taxonomia de Anaplasma spp. (Adaptado de Taylor et al., 2016). | 54 |
| Diagrama 4: Taxonomia de Ehrlichia spp. (Adaptado de Taylor et al., 2016). | 58 |

Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos

| | |
|---|---|
| °C – Graus Celsius | IBR – Rinotraqueíte Infeciosa Bovina |
| µl – Microlitros | ICF - Imunocromatografia |
| µm – Micrometros | IDT – Intradermotuberculização |
| µg – Microgramas | IFAT – Teste de Fluorescência de Anticorpos Indireto |
| AASM-CUA – Associação Agrícola de São Miguel e Cooperativa União Agrícola, CRL | IFN-γ – Interferão-gama |
| ADN – Ácido desoxirribonucleico | IgG – Imunoglobulina G |
| ARNr – Ácido ribonucleico ribossómico | IgM – Imunoglobulina M |
| BHV-1 – Herpesvírus tipo 1 | Kg – Quilograma |
| BPV – Papilomavírus Bovino | mL – Mililitros |
| BRSV – Vírus respiratório sincicial bovino | mg – Miligrama |
| BVD – Diarreia Viral Bovina | mmol – Milimole |
| CAT – Teste de Aglutinação em Cartão | mm – Milímetros |
| CCS – Contagem de Células Somáticas | n.º – Número |
| CE – Comissão Europeia | PBS – Tampão Fosfato-salino |
| CFT – Teste de Fixação do Complemento | PCR – Reação em Cadeia da Polimerase |
| CIISA – Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal | PI-3 – Parainfluenza tipo 3 |
| cm – Centímetros | PISA – Programa Informático de Saúde Animal |
| DAE – Deslocamento de Abomaso à Esquerda | QQIB – Queratoconjuntivite Infeciosa Bovina |
| DAD – Deslocamento de Abomaso à Direita | RMF – Retenção das membranas fetais |
| DGAV – Direção Geral de Alimentação e Veterinária | SNIRA – Sistema Nacional de Informação e Registo Animal |
| EEB – Encefalopatia Espongiforme Bovina | SRB – Síndrome Respiratória Bovina |
| EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetraacético | TCM – Teste Californiano de Mastites |
| ELISA – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática | TPM – Teste de Pré-movimentação |
| EU – União Europeia | TSA – Teste de Sensibilidade a Antibióticos |
| Fa – Frequência absoluta | UI – Unidades Internacionais |
| Fr – Frequência relativa | USP – Tamanho dos fios de sutura definido pela farmacopeia dos Estados Unidos da América |
| g – Unidade de medida da força centrífuga relativa | Vetal – Complexo Veterinário do Alto Alentejo |
| G – Gauge | x – Vezes |

1. Introdução

Como é referido no ponto 3º do artigo 4º do Código Deontológico Médico-Veterinário o exercício da atividade de Médico Veterinário “traduz-se em ações que visam o bem-estar e saúde animal, a conservação, o melhoramento e a gestão do património, incluindo o da fauna selvagem, a salvaguarda da saúde pública e proteção do meio ambiente”, podendo desenvolver-se em ações no âmbito da sanidade, clínica de animais, higiene pública, produção e melhoramento animal, entre outras. Deste modo, o estágio curricular do curso de Medicina Veterinária visa possibilitar a aprendizagem, treino e aprofundamento de conhecimentos numa área específica da Medicina Veterinária, neste caso na área da clínica e cirurgia de espécies pecuárias.

O presente relatório tem como objetivo apresentar a casuística observada, bem como as diferentes atividades desenvolvidas ao longo do estágio curricular efetuado para termino do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária.

O estágio curricular foi dividido em dois locais distintos; tendo decorrido na Associação Agrícola de São Miguel e Cooperativa União Agrícola (AASM-CUA), entre os dias 2 de setembro e 30 de outubro de 2019, e na VetAI – Complexo Veterinário do Alto Alentejo, entre 6 de novembro de 2019 e 28 de fevereiro de 2020.

Na AASM-CUA durante as nove semanas de estágio foi feito o acompanhamento de médicos veterinários que realizavam maioritariamente serviço de clínica e cirurgia bovina, com o intuito de adquirir competências nessa mesma área, foi também seguido um dos médicos veterinários responsáveis pelo serviço de assistência reprodutiva.

Na VetAI durante as 17 semanas de estágio realizou-se o acompanhamento dos médicos veterinários responsáveis pelos animais de produção e equinos, tendo sido desenvolvidas todas as tarefas relacionadas com essas espécies, de profilaxia, assistência reprodutiva e clínica médica e cirúrgica.

Numa segunda parte deste trabalho foi desenvolvida uma revisão bibliográfica sobre o tema: “Agentes transmitidos por carraças causadores de doença em bovinos: *Anaplasma* spp., *Babesia* spp., *Ehrlichia* spp. e *Theileria* spp.”; e na terceira foi incluído um estudo de caso: **pesquisa de agentes transmitidos por ixodídeos em bovinos assintomáticos na ilha de São Miguel, Açores**. Neste estudo pretendeu-se pesquisar agentes transmitidos por carraças e identificar as espécies presentes em 103 amostras provenientes de animais de dez explorações na ilha de São Miguel, Açores.

2. Relatório de estágio

2.1 Local de Estágio

A AASM-CUA foi fundada em 1975, com o objetivo de representar os agricultores da respetiva ilha. Atualmente presta diversos serviços aos seus sócios, tais como: serviços de saúde animal, de assistência médico-veterinária, de sanidade animal, de podologia bovina e farmácia; serviços na área da qualidade do leite, visitas à exploração, laboratório e consultoria; serviços de melhoramento animal, contraste leiteiro e registo no Livro Genealógico. Possui um sub-centro de inseminação artificial, serviço de emparelhamento, serviço de reprodução e centro de transferência embrionária; serviços no setor da carne, sendo que a AASM-CUA possui uma exploração para recria e engorda de bovinos; possui uma fábrica de alimentos (Rações Santana), com serviços de nutrição; serviços nas áreas comerciais, secção de máquinas e equipamento de ordenha e agrícolas, loja agrícola e armazém, serviços de apoio e vulgarização ao agricultor nas pastagens e forragens, oficina; possui um parque de exposição e restaurante; mercado agrícola; serviços de formação profissional e serviços de contabilidade e projetos.

A VetAI foi fundada em 2003, tendo originado um Centro de Atendimento Médico-Veterinário, a 11 de novembro de 2005. Foi fundada com o objetivo de proporcionar um serviço médico-veterinário abrangente e inovador na região do Alto Alentejo. Possui serviços no âmbito dos animais de companhia, equinos e animais de produção, tendo por base a satisfação das necessidades clínicas dos animais, bem como controlo e gestão reprodutiva da exploração. Possui para tal ao seu dispor três veículos móveis, o que lhe permite executar os serviços relativos às espécies pecuárias e equinos e domicílios de animais de companhia. O complexo veterinário está equipado com diversos equipamentos aptos na satisfação das necessidades de imagiologia (ecografia e raio-x), hemogramas, análises bioquímicas, entre outros. Além do serviço clínico presta também serviços de higiene e estética animal, tais como, banhos e tosquiadas a animais de companhia. Existe também uma parceria com a empresa VetAI – Eventos, onde estão incluídos o Centro Hípico do Alto Alentejo e o Hotel Canino VetAI.

Nos Açores existe essencialmente um regime de produção de bovinos de aptidão leiteira em pastoreio, existindo produções em sistemas intensivo e extensivo. A alimentação dos animais baseia-se maioritariamente num sistema de pastagem, sendo que devido à escassez de alimento em determinados períodos do ano os animais são suplementados essencialmente com silagem de milho e feno-silagem. Os efetivos são na sua maioria pequenos e familiares.

Por outro lado, no Alentejo destaca-se um regime extensivo, essencialmente de produção de bovinos de aptidão creatopoiética, pequenos ruminantes e suínos, cuja alimentação está dependente da pastagem, mas também da suplementação com fardos de palha ou feno e de concentrados de manutenção. Além dos efetivos em extensivo, existem também alguns efetivos intensivos, essencialmente, de engorda de bovinos. Ao contrário do que acontece nos Açores os efetivos no Alentejo são de elevadas dimensões.

Na ilha de São Miguel, os principais problemas que surgem ocorrem devido ao mau manejo, falta de registos e à carência em determinados nutrientes. Também o relevo acidentado da ilha por vezes proporciona o aumento da prevalência de determinados casos clínicos. Assim, a clínica predomina sobre a profilaxia, acabando por ser fundamentalmente uma clínica de urgência.

Por outro lado, no Alentejo as intervenções médico-veterinárias são essencialmente no âmbito profilático, devido ao tamanho elevado dos efetivos e modo de produção. Existe assim um maior controlo por parte das explorações, apesar do regime extensivo em que os animais se encontram; deste modo, a maioria dos casos clínicos que ocorrem têm urgência em ser resolvidos.

2.2 Casuística

Ao longo das 26 semanas de estágio foram registados todos os procedimentos efetuados, nas diferentes áreas e espécies, na aplicação Memento Database[®], com o objetivo de efetuar um relatório de estágio completo.

A casuística do relatório está dividida em cinco áreas: medicina preventiva e profilaxia, clínica médica, clínica cirúrgica, exames complementares de diagnóstico e controlo reprodutivo em espécies pecuárias. Além destas áreas será também abordada a casuística em assistência a equídeos e exames iniciais em montarias. As fotografias apresentadas foram tiradas durante o período de estágio. Deste modo, os procedimentos efetuados serão apresentados na forma de tabelas, com frequências absolutas (Fa) e relativas [Fr(%)], e de gráficos, elaborados no programa Microsoft Excel[®]. Serão também abordados de uma forma mais extensa procedimentos com maior relevância.

No Gráfico 1 pode-se observar a casuística referente ao estágio efetuado na AASM-CUA, num universo de 745 bovinos intervencionados nas diferentes áreas, dos quais 80,27% corresponderam a animais adultos. Como se pode concluir 39% das intervenções foram efetuadas no âmbito do controlo reprodutivo, no entanto, é de destacar os 33% que ocupa a clínica médica, uma vez que foi o principal objetivo do estágio.

No Gráfico 2, está detalhada a casuística referente ao estágio na VetAI, o qual foi dividido em diferentes espécies, como está demonstrado no Gráfico 3, onde se destaca a espécie bovina, 65%, e de seguida a espécie ovina, 28%. Em relação à casuística observada destaca-se a medicina preventiva e profilaxia, 96%, os números apresentados são muito discrepantes uma vez que a medicina preventiva e profilaxia correspondem a medicina de grupo, pelo que poderiam ser contabilizados por grupo em vez de indivíduo. De seguida, destacam-se as intervenções efetuadas no âmbito do controlo reprodutivo, 3%, e da clínica médica, 1%, num total de 8823 animais.

Em relação à casuística observada é importante referir que existem mais casos do que animais, uma vez que alguns animais possuíam mais do que um diagnóstico; nem todos os casos diagnosticados apresentam tratamento, uma vez que alguns animais foram eutanasiados e a casuística apresentada refere-se apenas aos casos acompanhados.

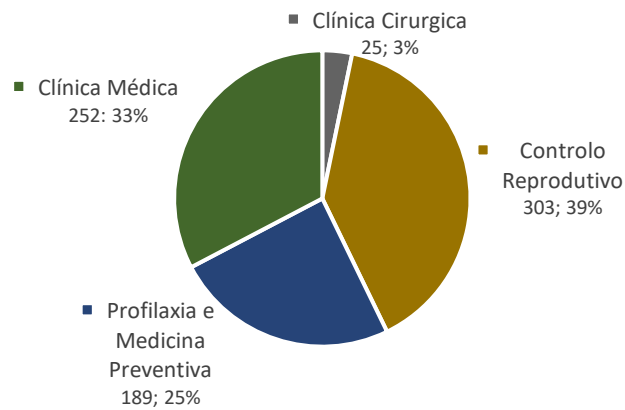


Gráfico 1: Distribuição da casuística observada em bovinos por área de intervenção na componente AASM-CUA, em frequência absoluta e relativa (%), (n = 769).

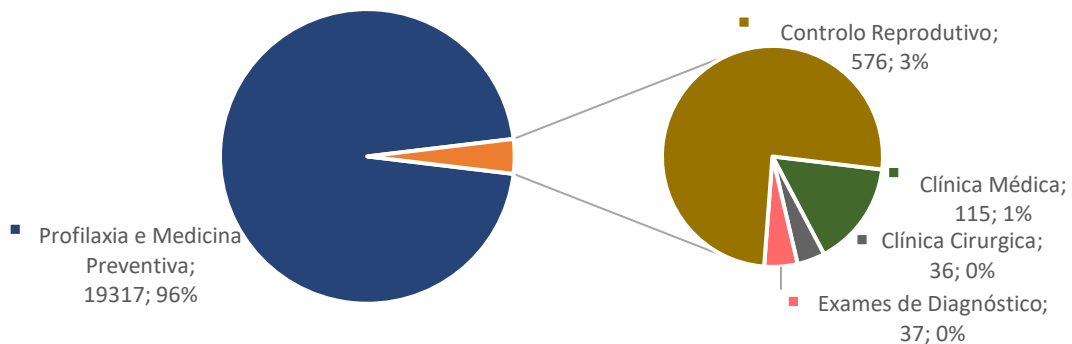


Gráfico 2: Distribuição da casuística observada nas diferentes espécies por área de intervenção na componente VetAI, em frequência absoluta e relativa (%), (n = 20081).

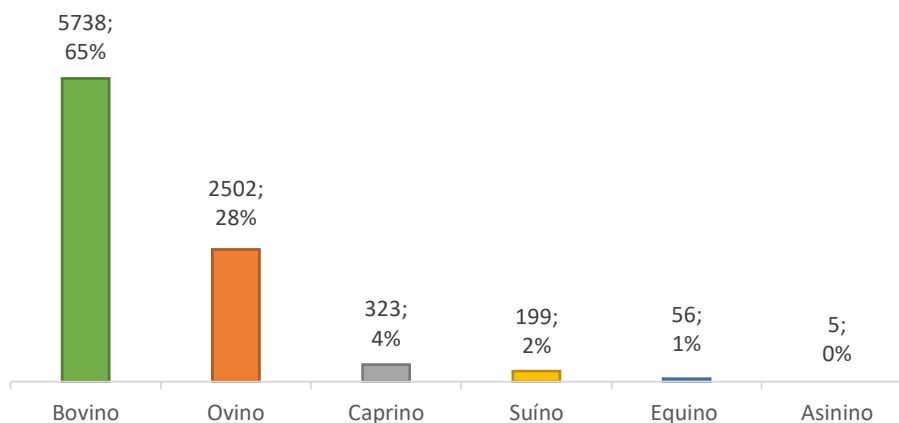


Gráfico 3: Distribuição dos números de animais intervencionados, por espécie, na componente VetAI, em frequência absoluta e relativa (%), (n = 8823).

2.2.1 Medicina preventiva

Na primeira parte do estágio, efetuada na AASM-CUA, não foi acompanhada nenhuma ação de rastreio oficial, uma vez que a equipa médico-veterinária se encontra dividida por funções. Apenas foram acompanhados médicos veterinários da área da clínica médica e da área da

reprodução animal. Deste modo, todas as ações de profilaxia efetuadas, estão englobadas na profilaxia facultativa. As colheitas de sangue foram efetuadas no âmbito da pesquisa de agentes transmitidos por ixodídeos em bovinos assintomáticos na ilha de São Miguel, Açores, pelo que não constam no gráfico 1.

Na segunda parte do estágio, efetuada na VetAI, a área que se destaca em termos de frequência na casuística é a medicina preventiva e profilaxia, uma vez que as explorações na região do Alentejo são maioritariamente explorações de aptidão creatopiética em extensivo, onde a profilaxia impera perante o tratamento.

Na

Tabela 1 estão descritas as ações efetuadas no âmbito da profilaxia e medicina preventiva.

Tabela 1: Distribuição das intervenções de profilaxia e medicina preventiva, consoante o local de estágio e espécie, em frequência absoluta (Fa) e relativa (Fr) (%), (n = 19560).

| Espécie | Procedimento | Local de estágio | | | | | |
|----------|-----------------------------------|------------------|--------|-------|--------|-------|--------|
| | | AASM-CUA | | VetAI | | Total | |
| | | Fa | Fr (%) | Fa | Fr (%) | Fa | Fr (%) |
| Bovinos | Vacinação | 147 | 50,34 | 4812 | 24,97 | 4959 | 25,35 |
| | Desparasitação | 2 | 0,68 | 3918 | 20,33 | 3920 | 20,04 |
| | Prova de intradermotuberculização | 0 | 0,00 | 2583 | 13,42 | 2583 | 13,21 |
| | Colheita de sangue | 103 | 35,27 | 1696 | 8,80 | 1696 | 9,20 |
| | Ocisão de emergência | 21 | 7,19 | 0 | 0,00 | 21 | 0,11 |
| | Colheita de tronco encefálico | 19 | 6,51 | 0 | 0,00 | 19 | 0,10 |
| Ovinos | Vacinação | 0 | 0,00 | 2277 | 11,82 | 2277 | 11,64 |
| | Desparasitação | 0 | 0,0 | 2097 | 10,88 | 2097 | 10,72 |
| | Colheita de sangue | 0 | 0,00 | 843 | 4,38 | 843 | 4,31 |
| | Identificação ou reidentificação | 0 | 0,00 | 149 | 0,77 | 149 | 0,76 |
| Caprinos | Vacinação | 0 | 0,00 | 320 | 1,60 | 320 | 1,64 |
| | Desparasitação | 0 | 0,00 | 320 | 1,66 | 320 | 1,64 |
| | Colheita de sangue | 0 | 0,00 | 43 | 0,22 | 43 | 0,22 |
| | Identificação ou reidentificação | 0 | 0,00 | 11 | 0,06 | 11 | 0,06 |
| Suínos | Vacinação | 0 | 0,00 | 199 | 1,03 | 199 | 1,02 |
| | Total | 292 | 100 | 19268 | 100 | 19560 | 100 |

No âmbito da medicina preventiva e profilaxia as ações efetuadas destinam-se ao grupo e não ao indivíduo, pelo que a contenção dos animais é de extrema importância para facilitar a

execução de cada procedimento. No caso da ilha de São Miguel, muitos dos efetivos não possuem *cornadis*, pelo que os procedimentos de vacinação tendem a ser executados aquando da ordenha; por outro lado, quando se trata de vacinação de vitelos, são feitas individualmente, consoante a idade e destino de cada animal, nos compartimentos de cada vitelo, como se pode observar nas Figura 1 e Figura 2. No Alentejo devido ao elevado número de animais por efetivo e para facilitar o maneio dos mesmos, a maioria dos procedimentos eram realizados em mangas de contenção, como está demonstrado na Figura 3, não só os procedimentos de medicina preventiva, como também outros procedimentos de clínica médica de modo a garantir a segurança dos operadores e dos animais, tanto em bovinos, como em ovinos e suínos.



Figura 1: Vitelo em caixa de madeira individual.

Figura 2: Vitelo em compartimento de cimento.

Figura 3: Ovelhas em manga de contenção.

2.2.1.1 Rastreio Oficial

Consideram-se ações de rastreio oficial todas as intervenções sanitárias efetuadas com base no programa nacional de saúde animal, como é descrito na Portaria n.º 178/2007, nomeadamente os planos de erradicação de tuberculose e brucelose, plano de vigilância de leucose e o plano de vigilância, controlo e erradicação da língua azul. Assim, as ações de saneamento têm como função a classificação sanitária de cada exploração.

O Decreto-Lei n.º 272/2000 estabelece as normas técnicas da execução do programa de erradicação da tuberculose bovina, o Decreto-lei n.º 244/2000 estabelece as normas técnicas de execução do programa de erradicação da brucelose, o Decreto-Lei n.º 79/2011 estabelece as normas técnicas da execução do programa plurianual de vigilância da leucose bovina e, por fim, o Edital n.º 53 de 2020 estabelece as normas epidemiológicas e profiláticas, no âmbito do controlo e combate à língua azul ou febre catarral ovina, com base no programa nacional de vigilância e erradicação da língua azul de 2018.

Assim, no caso dos bovinos, as ações profiláticas obrigatórias são a colheita de sangue, para rastreio de brucelose e leucose (programa de vigilância) e a prova de intradermotuberculização comparada (IDT), sendo que além de ambos os testes serem executados aquando do saneamento anual do efetivo, são efetuados como testes de pré-

movimentação (TPM), como está previsto no Decreto-Lei n.º157/98, ou em casos de reinspeções de brucelose e tuberculose. As colheitas de sangue foram efetuadas a partir da veia coccígea mediana, sendo posteriormente o sangue enviado para um laboratório autorizado pela Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV), para que seja efetuada a prova serológica *Rosa Bengala*, devendo ser efetuado a todos os animais com mais de 12 meses de idade. No caso da IDT comparada, consiste na administração de 0.1 mL de tuberculina aviária e bovina, por via intradérmica, na tábua do pescoço, com um distanciamento de cerca de 10 cm. Antes da inoculação procede-se à tricotomia dessa mesma zona e à medição da prega de pele utilizando um cutímetro, Figura 4. A leitura do teste é feita após 72 horas, sendo que são registadas todas as alterações das medições, como está demonstrado na Figura 5. O teste deve ser realizado a todos os animais com mais de 42 dias.



Figura 4: Medição com cutímetro de reação positiva no local de inoculação da tuberculina mamífera.



Figura 5: Reação positiva no local de inoculação da tuberculina mamífera.

No caso dos pequenos ruminantes as colheitas de sangue, para rastreio de brucelose, foram feitas a partir da veia jugular externa, sendo colhido sangue de 25% das fêmeas em idade reprodutiva, ou de todas, caso o efetivo seja menor que 50 animais, de todos os machos com mais de 6 meses e de todos os novos animais inseridos no rebanho desde o último controlo.

Em relação à língua azul, a vacinação obrigatória do efetivo ovino reprodutor adulto e dos jovens destinados à reprodução é a medida adotada para controlar a doença nas zonas onde se têm verificado indícios de circulação viral, como é descrito no edital em vigor.

A identificação animal está descrita no Decreto-Lei n.º142/2006, onde foi criado o Sistema Nacional de Informação e Registo Animal (SNIRA). No caso dos bovinos a sua identificação tem de ser executada até aos 20 dias de idade, pelos detentores dos animais, pelo que não constam na casuística. No caso dos ovinos e caprinos a identificação consta da casuística uma vez que a colocação dos bolos eletrónicos e dos brincos foi frequentemente feita pelo médico veterinário, até aos 9 meses de idade (no caso de explorações em sistemas extensivo).

Todas as atividades efetuadas foram registadas no Programa Informático de Saúde Animal (PISA), onde existe registo individual de cada intervenção.

Além das ações profiláticas estão também referidas as recolhas de tronco encefálico e ocisões de emergência efetuadas em bovinos na AASM-CUA.

As recolhas de tronco encefálico foram feitas de modo a aplicar o programa de vigilância, controlo e erradicação da encefalopatia espongiiforme bovina (EEB), cujas regras estão estabelecidas no Regulamento da Comissão Europeia n. 999/2001 de 22 de maio e suas alterações. No seguimento da vigilância ativa devem ser avaliados todos os bovinos com idade superior a 48 meses de determinados grupos específicos de animais, nomeadamente: bovinos sujeitos a abate especial de emergência, bovinos com sinais clínicos de doença (que não EEB) e bovinos mortos na exploração, transporte ou abegoaria. Na Região Autónoma dos Açores a recolha do tronco encefálico para a avaliação da presença de EEB é efetuada por serviços médico-veterinários de campo, como está descrito na Portaria n. 77/2011 de 13 de setembro publicada no Jornal Oficial da Região Autónoma dos Açores pela Secretaria Regional da Agricultura e Florestas.

É permitida a occisão de emergência por médicos veterinários no estabelecimento de produção primária, de forma a garantir o bem-estar animal, de animais feridos ou doentes, com dor e sofrimento, de modo a minimizar o transporte de cadáveres de animais nas vias públicas. Sendo que é atribuída uma participação financeira aos operadores económicos pela occisão de emergências destes animais, de modo a diminuir os encargos e prejuízos de tal prática, segundo a Portaria n. 111/2018 de 15 de outubro publicada no Jornal Oficial da Região Autónoma dos Açores pela Secretaria Regional da Agricultura e Florestas.

2.2.1.2 Profilaxia Facultativa

Todos os procedimentos de profilaxia que não façam parte dos planos de controlo e erradicação de doenças são consideradas ações facultativas.

Quando se efetuaram saneamentos anuais, foi feita a vacinação contra enterotoxémias e uma das desparasitações. As vacinas utilizadas estão descritas na Tabela 2. A escolha das vacinas utilizadas foi feita com base nos problemas de cada exploração, pelo médico veterinário em conformidade com o detentor da exploração.

Foram também feitas vacinações contra mastites e síndrome respiratório bovino (SRB), doenças que serão abordadas posteriormente. Bem como contra o mal rubro, em suínos, e a clamidiose, em ovinos.

As desparasitações internas em bovinos foram feitas essencialmente utilizando ivermectina e clorsulon, Ivomec F®, ou ivermectina, Virbamec® ou Paramectin 1%®, nas doses de 200 µg/kg por via subcutânea, ou doramectina, Dectomax Pour-On®, na dose de 500 µg/kg, por via percutânea.

Em vitelos, foi também utilizado fenbendazol, Panacur 2,5%®, na dose de 5mg/kg, por via oral. Em casos de suspeita de coccídeos foi utilizado diclazuril, Vecoxan®, em cabritos e borregos, na dose de 1 mg/kg, e em vitelos, toltrazuril, Baycox Bovis 50 mg/mL®, na dose 15 mg/kg, por via oral.

No caso dos ovinos foi utilizado moxidectina e triclabendazol, Cydectin TriclaMox 1mg/mL + 50mg/mL®, na dose de 0,2 mg/kg de moxidectina e 10 mg/kg de triclabendazol, por via oral, ou mebendazol e closantel sódico di-hidratado, Seponver Plus (75mg + 50mg)®, na dose de 10 mg/kg de closantel e 15 mg/kg de mebendazol, por via oral.

Para caprinos, foi utilizado eprinomectina, Eprinex Pour On 5mg/mL®, na dose 1mg/kg, por via cutânea, ou moxidectina e triclabendazol.

Tabela 2: Tabela resumo das vacinas utilizadas para imunização contra agentes infecciosos.

| Nome Comercial | Substâncias ativas | Dose | Via | Espécies |
|------------------------------|---|------|-----------------------------|----------|
| StartVac® | <i>Escherichia coli</i> inativada <i>Staphylococcus aureus</i> estirpe SP 140 | 2 mL | Intramuscular | Bovinos |
| Bovilis Bovipast RSP® | Vírus Respiratório Sincicial Bovino inativado Vírus inativado da Parainfluenza-3 <i>Mannheimia haemolytica</i> A1, inativada | 5 mL | Subcutânea | Bovinos |
| Respibov® | Vírus inativado da Rinotraqueíte Infeciosa Bovina Vírus inativado da Diarreia Viral Bovina Vírus Respiratório Sincicial Bovino inativado Vírus inativado da Parainfluenza-3 <i>Mannheimia haemolytica</i> inativada <i>Pasteurella multocida</i> inativada | 4 mL | Intramuscular ou subcutânea | Bovinos |
| Hiprabovis 4 Plus® | Vírus inativado da Rinotraqueíte Infeciosa Bovina Vírus inativado da Diarreia Viral Bovina Vírus da Parainfluenza-3 inativado | 3 mL | Intramuscular ou subcutânea | Bovinos |
| Heptavac P Plus® | Toxóide beta e épsilon de <i>Clostridium perfringens</i> Toxóide de <i>Clostridium septicum</i> Toxóide de <i>Clostridium tetani</i> Toxóide de <i>Clostridium novyi</i> Células de <i>Clostridium chauvoei</i> e toxóide equivalente Células mortas de <i>Mannheimia haemolytica</i> e <i>Pasteurella trehalosi</i> | 2mL | Subcutânea | Ovinos |
| Multivac 9® | Toxóide alfa, beta e épsilon de <i>Clostridium perfringens</i> tipo A, B, C e D Toxóide de <i>Clostridium novyi</i> Toxóide de <i>Clostridium septicum</i> Toxóide de <i>Clostridium tetani</i> Toxóide de <i>Clostridium sordellii</i> Anacultura de <i>Clostridium chauvoei</i> | 2 mL | Subcutânea | Ovinos |
| | | 4 mL | | Bovinos |

| | | | | |
|---------------------------------------|---|-----------|-----------------------------|--------------------|
| Bravoxin 10[®] | Toxoide alfa de <i>Clostridium perfringens</i> tipo A Toxoide beta de <i>Clostridium perfringens</i> tipo B e C Toxoide épsilon de <i>Clostridium perfringens</i> tipo D Cultura completa de <i>Clostridium chauvoei</i> | 1 mL | Subcutânea | Ovinos |
| | Toxoide de <i>Clostridium novyi</i> Toxoide <i>Clostridium septicum</i> Toxoide de <i>Clostridium tetani</i> Toxoide <i>Clostridium sordellii</i> Toxoide <i>Clostridium haemolyticum</i> | 2 mL | | Bovino |
| Enterovina[®] | Anatoxina épsilon de <i>Clostridium perfringens</i> tipo D Anacultura e anatoxina de <i>Clostridium perfringens</i> tipo A Anacultura de <i>Clostridium sordellii</i> <i>Pasteurella multocida</i> tipo I | 3 a 5 mL | Subcutânea | Ovinos Caprinos |
| | | 5 a 10 mL | | Bovinos |
| Syvazul BTV[®] | Vírus da língua azul inativado, sérotipos 1, 4 e 8 | 2 mL | Subcutânea | Ovinos |
| | | 4 mL | Intramuscular | Bovinos |
| Ovilis Enzovax[®] | <i>Chlamydophila abortus</i> viva atenuada, estirpe ts 1B | 2 mL | Intramuscular ou Subcutânea | Ovinos |
| Ruvax[®] | <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> , serotipo 2 | 2 mL | Intramuscular | Suínos |
| Prequenza TE[®] | Vírus da influenza equina das estirpes A/equine-2/South Africa/4/03 e A/equine-2/Newmarket/2/93 Toxoide tetânico | 1 mL | Intramuscular | Equinos |

2.2.2 Clínica médica

Na clínica médica destaca-se o estágio efetuado na AASM-CUA, como se pode observar no gráfico Gráfico 4; a maioria dos casos descritos são referentes à espécie bovina.

No estágio efetuado na AASM-CUA existe um total de 252 casos clínicos observados, enquanto no realizado na VetAI existe um total de 110 casos, discrepância esta devido ao tipo de produção em cada local.

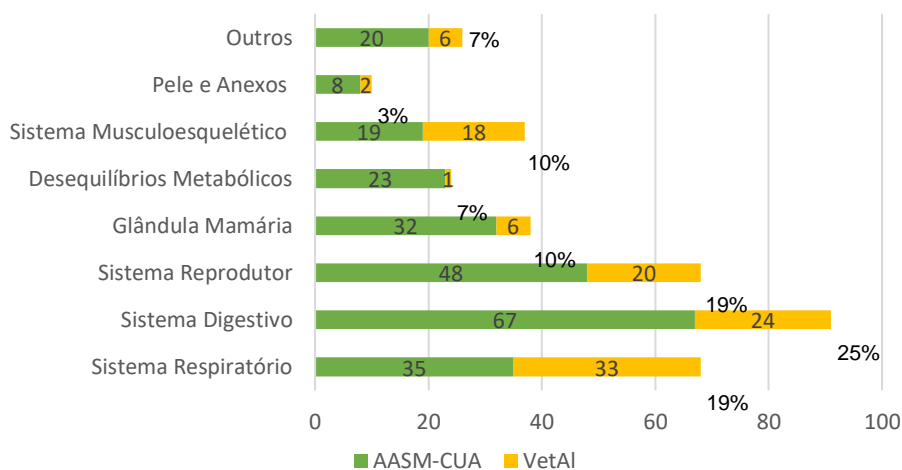


Gráfico 4: Distribuição da casuística observada na área da clínica médica na AASM-CUA e na VetAI, em frequência absoluta e relativa (%), (n = 362).

2.2.2.1. Sistema Respiratório

O sistema respiratório é dos sistemas com maior número de casos clínicos observados (68 casos) como se regista na Tabela 3. São mencionados alguns aspetos importantes sobre o sistema respiratório dos bovinos, uma vez que a casuística apresentada nas restantes espécies é reduzida.

A casuística observada apresenta elevados valores uma vez que o estágio curricular decorreu especialmente durante os meses de outono e inverno, com elevada pluviosidade e oscilações de temperatura.

As doenças respiratórias dos bovinos são frequentes e graves por razões fisiológicas e de manejo, nomeadamente: capacidade respiratória relativamente pequena em relação às suas necessidades metabólicas, pelo que pequenas perdas de parênquima pulmonar funcional resultam num enorme impacto; a frequência respiratória é elevada o que facilita o transporte de aerossóis; a velocidade de transporte pelo aparelho muco-ciliar é relativamente lenta, quando comparada com outros animais do mesmo tamanho e de espécies diferentes; os septos interalveolares apresentam uma espessura elevada e uma elasticidade reduzida, prejudicando a recuperação de processos inflamatórios devido à compartimentação; a árvore brônquica é muito estreita e os alvéolos terminam em fundo saco no final dos bronquíolos; os pulmões possuem poucos macrófagos alveolares; suscetibilidade acrescida a *Mannheimia haemolytica* (Stilwell, 2013).

Tabela 3: Distribuição dos casos de clínica médica referentes ao sistema respiratório, consoante local de estágio e espécie, em frequência absoluta (Fa) e relativa (Fr) (%) (n = 68).

| Espécie | Diagnóstico | Local de estágio | | | | | |
|---------|----------------------------------|------------------|--------|-------|--------|-------|--------|
| | | AASM-CUA | | VetAI | | Total | |
| | | Fa | Fr (%) | Fa | Fr (%) | Fa | Fr (%) |
| Bovinos | Pneumonia em vitelos | 16 | 45,71 | 26 | 78,79 | 42 | 61,76 |
| | Pneumonia em animais adultos | 18 | 51,43 | 5 | 15,15 | 23 | 33,82 |
| | Inflamação da traqueia em vitelo | 1 | 2,86 | 0 | 0,00 | 1 | 1,47 |
| Ovinos | Pneumonia | 0 | 0,00 | 2 | 6,06 | 2 | 2,94 |
| | Total | 35 | 100 | 33 | 100 | 68 | 100 |

A SRB é o maior problema de saúde bovina em todo o mundo, com elevadas perdas económicas. A SRB é uma síndrome multifatorial envolvendo agentes infecciosos, fatores ambientais e comprometendo o sistema imunitário, englobando um conjunto de doenças respiratórias dos bovinos: pneumonia, broncopneumonia, febre do transporte, pasteurelose pneumónica, pleuropneumonia fibrinosa, rinite, traqueíte, bronquite, entre outros (Härtel *et al.*, 2004; Grissett *et al.*, 2015; Lomillos & Alonso, 2019).

Os principais agentes relacionados com SRB são: vírus da parainfluenza tipo 3 (PI-3), vírus da diarreia viral bovina (BVD), vírus da rinotraqueíte bovina (IBR), vírus respiratório sincicial bovino (BRSV), *Mannheimia haemolytica*, *Mycoplasma bovis*, *Pasteurella multocida* e *Histophilus somni*. Além destes agentes existem também agentes parasitários e fúngicos. Estes agentes podem interagir entre eles, com uma reação inflamatória ou alérgica para desencadear a sintomatologia completa da doença (Grissett *et al.*, 2015; Lomillos & Alonso, 2019).

Os agentes patogênicos virais causam infecções primárias que provocam sinais clínicos de SRB suaves, suprimem o sistema imunitário levando a infecções secundárias bacterianas, sendo que estes são inalados para os pulmões, podendo então aderir e colonizar a superfície pulmonar (Griffin *et al.*, 2010; Grissett *et al.*, 2015). Entre os sinais clínicos encontram-se: inapetência, tosse, corrimento nasal de diversa índole, dispneia, depressão e uma síndrome febril (Lomillos & Alonso, 2019). A persistência de sinais clínicos, como tosse e dispneia, são sugestivos de mau prognóstico, devido à fraca capacidade dos bovinos em recuperarem a funcionalidade do pulmão afetado (Stilwell, 2013). A lesão mais característica é uma broncopneumonia ou pneumonia de caráter fibroso (Lomillos & Alonso, 2019).

A incidência e gravidade da doença dependem dos fatores relacionados com o animal, das condições ambientais, do manejo prévio e atual, e a presença e difusão de determinados agentes infecciosos (Triviño, 2016).

Quando observados os dados da Tabela 3, em relação à AASM-CUA, existe uma semelhança entre os casos de pneumonia em vitelos e em pneumonia em bovinos adultos; por outro lado, quando comparados os casos clínicos observados na VetAI existe uma elevada quantidade de casos em vitelos, uma vez que se trataram de casos provenientes de uma engorda de bovinos. Estima-se que 20-40% dos animais que entram na engorda apresentarão sinais clínicos compatíveis com SRB e necessitarão de tratamento médico (Triviño, 2016). Deste modo, o tratamento efetuado em grupo foi diferente do tratamento efetuado a animais individuais.

O tratamento de SRB pode dividir-se em etiológico (antibióticos) e sintomático (anti-inflamatórios) (Triviño, 2016). Na AASM-CUA, no caso dos vitelos os antibióticos utilizados foram: florfenicol (Nuflor® 300mg/mL, na dose 20 mg/kg, por via intramuscular) ou amoxicilina e colistina (Amoxycol®, na dose 10 mg/kg de amoxicilina e 25000 UI/kg de sulfato de colistina, por via intramuscular), no caso de animais adultos era utilizado amoxicilina com ácido clavulânico (Noroclav®, na dose 7 mg/kg de amoxicilina e 1,75 mg/kg de ácido clavulânico, por via intramuscular). Na VetAI, em caso de pneumonia o antibiótico mais utilizado foi a tulatromicina (Draxxin® 100 mg/mL, na dose 2,5 mg/kg, por via subcutânea). Em relação aos anti-inflamatórios utilizados, recorreu-se ao uso de anti-inflamatórios não esteroides mais frequentemente, como meloxicam (Metacam® 20mg/mL, na dose 0,5 mg/kg, por via subcutânea ou endovenosa) ou carprofeno (Rimadyl® 50 mg/mL, na dose, 1,4 mg/kg, por via subcutânea), em casos mais graves recorreu-se ao uso de dexametasona (Dexafort®, na dose de 0,0264 mg/kg de fosfato sódico de dexametasona e 0,0534 mg/kg de fenilpropionato de dexametasona, por via intramuscular). Deste modo, um exame físico cuidado e completo é de extrema importância na escolha do

tratamento adequado. Também a aptidão do animal, devido aos intervalos de segurança a cumprir, é de extrema importância no momento da escolha de fármacos a administrar, uma vez que elevados intervalos de segurança levam a grandes perdas, especialmente em bovinos de carácter leiteiro, dado que o leite tem de ser eliminado durante vários dias; igualmente, o manejo dos animais importa no momento de escolha de fármacos, uma vez que, para animais em extensivo nem sempre é possível a repetição de tratamentos, pelo que fármacos de dose única são muitas vezes escolhidos.

A vacinação é de extrema importância para a diminuição da SRB, de modo a garantir o bem-estar animal e a produtividade ideal dos animais (Schumacher *et al.*, 2019). Assim, muitos efetivos, tanto na ilha de São Miguel como no Alentejo, são vacinados contra agentes que provoquem SRB, utilizando vacinas referidas na Tabela 2, para não só evitar o aparecimento de sinais respiratórios, como também de outros sinais causados pelos mesmos agentes, como por exemplo, sintomatologia reprodutiva ou digestiva.

2.2.2.2. Sistema Digestivo

Observando a Tabela 4 conclui-se que os casos mais frequentes foram de síndrome diarreia neonatal (51,65%), pelo que é o tema abordado em maior pormenor, bem como, gastroenterite em bovinos adultos (17,58%).

Tabela 4: Distribuição dos casos de clínica médica referentes ao sistema digestivo, consoante local de estágio e espécie, em frequência absoluta (Fa) e relativa (Fr) (%) (n = 91).

| Espécie | Diagnóstico | Local de estágio | | | | | |
|---------|--|------------------|--------|-------|--------|-------|--------|
| | | AASM-CUA | | VetAI | | Total | |
| | | Fa | Fr (%) | Fa | Fr (%) | Fa | Fr (%) |
| Bovinos | Síndrome diarreia neonatal | 30 | 44,78 | 17 | 70,83 | 47 | 51,65 |
| | Gastroenterite em bovinos adultos | 14 | 20,90 | 2 | 8,33 | 16 | 17,58 |
| | Acidose | 6 | 8,96 | 0 | 0,00 | 6 | 6,59 |
| | Dilatação intestinal | 3 | 4,48 | 0 | 0,00 | 3 | 3,30 |
| | Suspeita de corpo estranho | 3 | 4,48 | 0 | 0,00 | 3 | 3,30 |
| | Timpanismo espumoso | 3 | 4,48 | 0 | 0,00 | 3 | 3,30 |
| | Deslocamento de abomaso à esquerda (DAE) | 2 | 2,99 | 0 | 0,00 | 2 | 2,20 |
| | Suspeita de torção intestinal | 2 | 2,99 | 0 | 0,00 | 2 | 2,20 |
| | Timpanismo gasoso | 1 | 1,49 | 1 | 4,17 | 2 | 2,20 |
| | Deslocamento de abomaso à direita (DAD) | 1 | 1,49 | 0 | 0,00 | 1 | 1,10 |
| | Faringite | 1 | 1,49 | 0 | 0,00 | 1 | 1,10 |

| | | | | | | | |
|----------|--------------------------|----|------|----|-------|----|------|
| | Intoxicação por nitratos | 1 | 1,49 | 0 | 0,00 | 1 | 1,10 |
| Ovinos | Gastroenterite | 0 | 0,00 | 1 | 4,17 | 1 | 1,10 |
| Caprinos | Gastroenterite | 0 | 0,00 | 3 | 12,50 | 3 | 3,30 |
| | Total | 67 | 100 | 24 | 100 | 91 | 100 |

As mortes de vitelos durante o período neonatal são um dos problemas de maior importância nas explorações de bovinos, sendo que as diarreias são consideradas a principal causa de perda de produtividade e de perdas económicas em bovinos de aptidão creatopiética. São conhecidos múltiplos agentes patogénicos causadores, ou que contribuam para o desenvolvimento de diarreias neonatais, sendo que a severidade e a progressão da doença dependem de fatores ambientais e das práticas de manejo. Deste modo, o facto de ser uma doença multifatorial torna-a de difícil controlo, que deve ser baseado na compreensão da complexidade da doença, sendo importante o diagnóstico da origem da diarreia de forma a que o tratamento seja adequado; podem ser utilizados testes rápidos para diagnosticar o agente infeccioso em questão, como está demonstrado na Figura 6. Os fatores envolvidos na ocorrência de diarreia neonatal são: manejo do vitelo recém nascido, imunidade do vitelo e *stress* ambiental ou contaminações (Cho & Yoon, 2014; Ok *et al.*, 2020).

Na Tabela 5 estão enumerados os agentes causadores de diarreias neonatais, a idade em que afetam os vitelos e o tipo de diarreia causada.

Tabela 5: Agentes, idade em que são mais prováveis e tipo de diarreia neonatal (Adaptado de Stilwell, 2013).

| Agente | Idade (dias) | Tipo de diarreia |
|------------------------------------|--------------|--|
| <i>E. coli</i> (ETEC) | 1 - 5 | Hipersecreção (toxina com efeito osmótico) |
| <i>Cryptosporidium</i> spp. | 7 - 21 | Má-absorção (atrofia das vilosidades) |
| Coronavírus | 7 – 15 | Má-absorção (atrofia das vilosidades) |
| Rotavírus | 7 – 21 | Destruição da parede = Má absorção (provavelmente também hipersecretora = toxina) |
| <i>Clostridium</i> spp. | >15 | Hipersecretora (conteúdo hiperosmótico) |
| <i>Salmonella</i> spp. | Variável >7 | Mista, mas mais por má-absorção |
| Alimentar | Variável | Hiperosmótica. Alérgica. |

Uma vez que a evolução das diarreias nos neonatos pode ser rápida, um diagnóstico precoce tem especial importância, não só para que se consiga fazer um tratamento efetivo nos animais infetados, mas também para que o médico veterinário e o produtor consigam alcançar estratégias de manejo de forma a minimizar prejuízos (Cho & Yoon, 2014).



Figura 6: Teste rápido para diarreias positivo a *Cryptosporidium sp.*

O controlo efetivo das diarreias neonatais pode ser baseado em três pontos principais: claro conhecimento das características dos agentes patogénicos; vantagens e desvantagens dos métodos de diagnóstico; manejo vaca-vitelo correto (Cho & Yoon, 2014).

O tratamento efetuado, na maioria dos casos, foi um tratamento sintomático, baseado num exame físico cuidado, como está demonstrado na Figura 7. Deve ter-se em atenção sinais de: desidratação, acidose, febre, presença de reflexo de sucção, estado alerta do animal, sinais de endotoxemia ou a presença de outros sinais clínicos, tais como: alterações respiratórias, claudicação, sinais de dor ou sinais neurológicos. O tratamento deve ser efetuado com base na distinção entre diarreia infecciosa e diarreia alimentar.



Figura 7: Realização de exame físico em vitelo com diarreia.

Os tratamentos efetuados basearam-se em fluidoterapia endovenosa, utilizando Lactato de Ringer, soro enriquecido em vitaminas, minerais e aminoácidos (Duphalyte[®] ou Neatox[®]) e bicarbonado de sódio, ou fluidoterapia oral, com entubação nasogástrica; utilizaram-se saquetas de nutrientes e eletrólitos. Em relação à terapêutica anti-inflamatória, foi utilizado essencialmente meloxicam, ou flunixin meglumina (Fynadine 50 mg/mL[®], na dose de 2,2 mg/kg, por via endovenosa ou intramuscular), em casos de ausência de desidratação. Por fim, em relação à antibioterapia, os antibióticos mais utilizados foram sulfadiazina e trimetoprim (Gorban 24%[®], na dose de 15 mg/kg, por via endovenosa ou intramuscular) e enrofloxacin (Baytril 100 mg/mL[®], na dose de 5 mg/kg, por via endovenosa ou subcutânea).

Além das diarreias em vitelos, destacaram-se também as gastroenterites em animais adultos. A sua origem pode ser variada, de origem alimentar ou infecciosa, parasitária, vírica ou bacteriana (Stilwell, 2013). Muitos dos casos de gastroenterite observados ao longo do estágio levaram a uma suspeita de paratuberculose, devido aos sinais clínicos apresentados pelos animais, tais como: diarreia crónica, quebra na produção, baixa condição corporal, diarreia profusa e aquosa, edema submandibular, sinais compatíveis com a doença, como se pode observar nas Figura 8 e Figura 9.



Figura 8: Vaca com diarreia aquosa e profusa.



Figura 9: Vaca com edema submandibular.

A paratuberculose é provocada pelo bacilo *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* (McAloon *et al.*, 2019). A maioria das novas infeções ocorre pela via fecal-oral, embora a infeção seja possível por outras vias. Os vitelos nascidos de vacas soropositivas mostraram 6,6 vezes maior possibilidade de serem soropositivos em comparação com os vitelos nascidos de vacas soronegativas. A taxa de infeção num efetivo normalmente é muito alta, no entanto, a mortalidade não ultrapassa 1% anual, sendo que a doença subclínica afeta 10-20% do efetivo. Após a confirmação da doença nos animais, estes devem ser eliminados da exploração; caso não seja possível, deve tentar baixar-se os níveis de infeção, prevenir novas infeções e aumentar a resistência à doença; devem também aumentar-se as medidas de biossegurança da exploração e fazer testes serológicos sucessivos e frequentes (Fecteau, 2018; Stilwell, 2013).

Nas diarreias em adultos além de um tratamento semelhante ao que era feito em vitelos, eram também adicionadas leveduras de *Saccharomyces cerevisiae*, cápsulas de TriStart[®], e saquetas de alimento complementar dietético para a redução do risco de acidose, Omasin[®], ou um preparado, Rumen-Bovisal[®].

Os casos de acidose observados ocorreram em bovinos de carácter leiteiro, como é mais comum, devido à sua alimentação rica em alimento concentrado. Embora a alimentação rica em concentrado seja a principal causa de acidose ruminal em bovinos leiteiros, ocorre também em vacas de pastagem (Oetzel, 2017). O aumento de energia na alimentação dos animais prejudica a estratificação ruminal, leva a que exista uma menor mastigação dos alimentos e consequentemente a uma diminuição da produção de tampão salivar, à diminuição da motilidade das paredes do rúmen e à mistura dos conteúdos ruminais (Humer *et al.*, 2018).

Os casos de timpanismo foram observados na ilha de São Miguel. O timpanismo espumoso ocorre essencialmente durante a adaptação do bovino a pastagens, devido às alterações na

velocidade de trânsito alimentar ou da produção de saliva (Stilwell, 2013). Os casos de timpanismo gasoso ocorrem devido à incapacidade de eructar e libertar o gás contido no rúmen (Foster, 2017).

Nos casos de suspeita de torção intestinal os animais não possuíam fezes na ampola retal, apresentavam-se inquietos e demonstravam sinais de dor. Os animais observados foram encaminhados de imediato para matadouro, uma vez que o tratamento cirúrgico não era opção.

Os deslocamentos de abomaso incluídos na casuística de clínica médica foram casos em que após uma segunda observação do animal (12-24 horas depois), o abomaso se encontrava na sua posição anatómica normal.

2.2.2.3. Sistema Reprodutor

Ao observar-se a Tabela 6 verifica-se que o caso clínico mais frequente foi a retenção das membranas fetais (RMF) (33,82%), seguindo-se de distocia (30,88%) e metrite (14,71%), em bovinos.

No caso das distocias foram mais abundantes no estágio efetuado na VetAI, uma vez que os efetivos visitados eram de aptidão creatopoiética, sendo mais frequente o surgimento de distocias devido a desproporção feto-materna, em especial em animais primíparas (Funnell & Hilton, 2016).

Tabela 6: Distribuição dos casos de clínica médica referentes ao sistema reprodutor, consoante local de estágio e espécie, em frequência absoluta (Fa) e relativa (Fr) (%) (n = 68).

| | | Local de estágio | | | | | |
|----------|-------------------------------------|------------------|--------|-------|--------|-------|--------|
| | | AASM-CUA | | VetAI | | Total | |
| Espécie | Diagnóstico | Fa | Fr (%) | Fa | Fr (%) | Fa | Fr (%) |
| Bovinos | Retenção das membranas fetais (RMF) | 21 | 43,75 | 2 | 10,00 | 23 | 33,82 |
| | Distocia | 8 | 16,67 | 13 | 65,00 | 21 | 30,88 |
| | Metrite puerperal | 9 | 18,75 | 1 | 5,00 | 10 | 14,71 |
| | Endometrite | 4 | 8,33 | 0 | 0,00 | 4 | 5,88 |
| | Torção uterina | 2 | 4,17 | 2 | 10,00 | 4 | 5,88 |
| | Laceração vaginal | 2 | 4,17 | 0 | 0,00 | 2 | 2,94 |
| | Aborto | 1 | 2,08 | 0 | 0,00 | 1 | 1,47 |
| | Clamidiose (em rebanho) | 0 | 0,00 | 1 | 5,00 | 1 | 1,47 |
| | Distocia | 0 | 0,00 | 1 | 5,00 | 1 | 1,47 |
| Caprinos | Metrite puerperal | 1 | 2,08 | 0 | 0,00 | 1 | 1,47 |
| | Total | 48 | 100 | 20 | 100 | 68 | 100 |

Considera-se RMF quando estas não foram expelidas 12 horas após o parto. A RMF leva a enormes perdas especialmente na indústria leiteira, uma vez que afeta o potencial de produção

e compromete o seu futuro reprodutivo (Pathak *et al.*, 2015). Considera-se que a incidência em bovinos leiteiros varia entre 3 a 12%. A expulsão das membranas fetais é um processo inflamatório na junção útero-placenta, a ativação da resposta imunitária materna contra as membranas fetais desempenha um papel importante na separação das mesmas, ocorrendo um afluxo de células imunitárias, um aumento da expressão e secreção de citocinas pró-inflamatórias e remodelação dos tecidos (Boro *et al.*, 2014; Boro *et al.*, 2015). Os fatores predisponentes para que ocorra RMF mais frequentemente apontados são: imunodepressão (devido a *stress*, balanço energético negativo ou carência em anti-oxidantes, como selênio e vitamina E, por exemplo); traumas e isquemia (por fetos grandes, partos gemelares, distocias ou manobras obstétricas); falta de maturação da placenta (por aborto ou partos precoces); lesões placentárias de origem infecciosa (por *Brucella* spp.) (Stilwell, 2013). A RMF é um fator de risco para uma subsequente cetose, deslocamento de abomaso ou mastite (Imhof *et al.*, 2019).

A RMF não deve ser considerada uma doença, mas sim um fator predisponente para metrites puerperais. Assim, a ocorrência de metrite pós-parto depende de uma série de fatores que afetam a ação dos mecanismos de resistência. Os fatores predisponentes ao aparecimento de metrite são: *stress*, balanço energético negativo, cetose, agentes infecciosos, parto distócico e aborto, também a hipocalcemia subclínica favorece o aparecimento de metrite uma vez que atrasa a involução uterina, permitindo a acumulação de fluidos. Os agentes mais frequentemente envolvidos em metrites puerperais são: coliformes, bactérias anaeróbias (tais como: *Fusobacterium necrophorum*, *Prevotella melaninogenicus* e *Clostridium* spp.) e *Trueperella pyogenes* (Stilwell, 2013).

Em ambos os casos o tratamento efetuado baseou-se na utilização de anti-inflamatórios, nomeadamente meloxicam ou flunixina meglumina; antibioterapia, ampicilina (Albipen 100 mg / mL LA[®], na dose 15 mg/kg, por via intramuscular); suplementação com selênio e vitamina E (Selbion[®], cerca de 0,06 mg/kg de selênio e 15 mg/kg de vitamina E, por via intramuscular) e fluidoterapia em casos de sinais de endotoxemia.

Parto distócico é definido como o parto em que ocorre alguma alteração da sua evolução natural, especialmente na fase de expulsão (Stilwell, 2013). As principais causas de distocia são: desproporção materno-fetal, posição anormal do feto, estenose vulvar, vaginal ou cervical, torção uterina ou inércia uterina. Algumas das consequências dos partos distócicos são: aumento da morbidade e mortalidade do vitelo e da vaca, redução da fertilidade e subsequente aumento do intervalo entre partos (Funnell & Hilton, 2016).

No caso dos partos distócicos acompanhados na AASM-CUA além de manobras obstétricas eram utilizadas cordas para retirar os vitelos, utilizando a força do homem, uma vez que se tratavam de vitelos de menores dimensões; no caso dos partos distócicos acompanhados na VetAl recorria-se ao uso do extrator obstétrico.

Após a extração do vitelo a maioria das vacas foi medicada com anti-inflamatório, flunixina meglumina, ou em casos de lesão nervosa, dexametasona; antibioterapia, normalmente

oxitetraciclina (Oxymicin LA 300mg/mL[®], na dose de 30 mg/kg, por via intramuscular); sendo suplementada com selênio e vitamina E.

Como já foi referido, no Alentejo com as produções extensivas, a medicina de grupo tem uma importância especial, pelo que o caso referido como “clamidiose (em rebanho)” refere-se a um rebanho de ovinos com sintomatologia abortiva, que foi confirmado como *Chlamydia abortus* laboratorialmente. Após a confirmação foram vacinados com *Ovilis Enzovax*[®], vacina referida na Tabela 2, todos os animais em que o parto já tinha ocorrido e todos cujo diagnóstico de gestação por ecografia foi confirmado como negativo; os animais com diagnóstico de gestação positivo foram tratados com oxitetraciclina, na dose de 30 mg/kg, por via intramuscular.

2.2.2.4. Glândula mamária

A maioria dos casos observados relativamente à glândula mamária são referentes ao estágio na AASM-CUA, uma vez que os efetivos visitados eram maioritariamente de aptidão leiteira, como consta na Tabela 7.

Tabela 7: Distribuição dos casos de clínica médica referentes a afeções da glândula mamária, consoante local de estágio e espécie, em frequência absoluta (Fa) e relativa (Fr) (%) (n = 38).

| Espécie | Diagnóstico | Local de estágio | | | | | |
|----------|----------------------------|------------------|--------|-------|--------|-------|--------|
| | | AASM-CUA | | VetAl | | Total | |
| | | Fa | Fr (%) | Fa | Fr (%) | Fa | Fr (%) |
| Bovinos | Mastite clínica | 28 | 87,5 | 2 | 33,33 | 30 | 78,95 |
| | Obstrução do canal do teto | 2 | 6,25 | 0 | 0,00 | 2 | 5,26 |
| | Trauma e edema do úbere | 2 | 6,25 | 0 | 0,00 | 2 | 5,26 |
| Ovinos | Mastite clínica | 0 | 0,00 | 1 | 16,67 | 1 | 2,63 |
| | Obstrução do canal do teto | 0 | 0,00 | 1 | 16,67 | 1 | 2,63 |
| Caprinos | Mastite clínica | 0 | 0,00 | 2 | 33,33 | 2 | 5,26 |
| | Total | 32 | 100 | 6 | 100 | 38 | 100 |

Mastite é a designação dada à inflamação da glândula mamária resultante da invasão por algum agente patogénico, alérgico ou trauma físico (Ashraf & Imran, 2018). As mastites representam a doença contagiosa economicamente mais importante em vacas de aptidão leiteira, quer pela diminuição da produção de leite, pelos custos veterinários e pelo leite que tem de ser desperdiçado durante o tempo de tratamento e intervalos de segurança, sendo uma doença dolorosa para os animais (Krömker & Leimbach, 2017; Ashraf & Imran, 2018; Simões *et al.*, 2019).

As mastites são mais frequentemente reconhecidas na sua forma clínica, definida pela presença de uma alteração visível do leite, como é demonstrado na Figura 10. O leite proveniente de um quarto com mastite clínica pode ser aguado ou espessado e descolorado com sangue, pus, ou coágulos, na Figura 11 são observadas diferentes apresentações do leite proveniente de quartos com mastite clínica (Jones, 2016).



Figura 10: Leite de mastite clínica.

Animais com mastite clínica podem apresentar alterações visíveis no úbere, bem como apresentar sinais sistêmicos, tais como, febre, desidratação, fraqueza e inapetência (Jones, 2016). Na figura Figura 12 observa-se um edema ventral resultante de uma mastite provocada por *Escherichia coli*.



Figura 11: Leite de mastite clínica hemolítica.

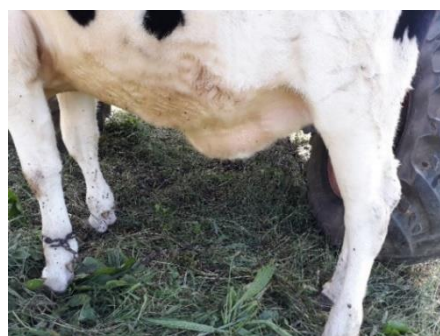


Figura 12: Edema ventral devido a mastite provocada por *Escherichia coli*.

No caso das mastites subclínicas não existem sinais visíveis no úbere nem no leite, sendo diagnosticadas através de: teste californiano de mastites (TCM) ou contagem de células somáticas (CCS) (Ashraf & Imran, 2018). O TCM é efetuado através da colocação de cerca de 2 mL de leite e 2 mL de reagente em cada poço da raquete, consoante o quarto, agita-se levemente e avalia-se visualmente a alteração da viscosidade ao fim de cerca de 45 segundos, caso o resultado seja negativo a mistura permanece líquida sem evidência de formar precipitado; caso seja positivo, classifica-se em três níveis: no primeiro forma-se um precipitado distinto, mas sem tendência à formação de gel, no segundo, a mistura engrossa imediatamente ocorrendo a formação de gel e com o movimento, as misturas tendem a mover-se em direção ao centro, por fim, no terceiro forma-se um gel distinto que tende a aderir ao fundo da raquete e forma-se um pico central durante os movimentos (Kandeel *et al.*, 2018). Considera-se que um valor superior a 200 000 células somáticas/mL de leite indica que um ou mais quartos estão infetados (Royster & Wagner, 2015).

As mastites bovinas são caracterizadas por serem uma doença multifatorial, influenciada pelo hospedeiro, pelo agente patogénico (na maioria dos casos, bacteriano), bem como, por fatores ambientais (Krömker & Leimbach, 2017; Simões *et al.*, 2019).

As bactérias que causam mastite mais frequentemente são classificadas como agentes contagiosos e agentes ambientais; os agentes contagiosos são transmitidos de vaca para vaca, no momento da ordenha, e os agentes ambientais são aqueles cujo reservatório é no ambiente dos bovinos (Royster & Wagner, 2015). Na Tabela 8 estão mencionados os principais agentes contagiosos e ambientais causadores de mastites.

Tabela 8: Agentes causadores de mastite (Adaptado de Blowey & Edmondson, 2010).

| Agentes contagiosos | Agentes ambientais | |
|--|-------------------------------|-------------------------------|
| <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Streptococcus uberis</i> | |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> | Coliformes | <i>Escherichia coli</i> |
| <i>Staphylococcus coagulase-negativa</i> | | <i>Citrobacter</i> |
| <i>Streptococcus dysgalactiae</i> | | <i>Enterobacter</i> |
| <i>Corynebacterium bovis</i> | | <i>Klebsiella</i> |
| <i>Mycoplasma</i> | | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| | <i>Bacillus cereus</i> | |
| | <i>Bacillus licheniformis</i> | |
| | <i>Streptococcus faecalis</i> | |
| | Fungos | |
| | Leveduras | |

Quanto mais cedo a doença for identificada menores serão os danos provocados (Ashraf & Imran, 2018).

Nos casos acompanhados, o tratamento efetuado foi decidido com base no aspeto macroscópico do leite, numa diferenciação entre a suspeita de agentes gram-negativos e gram-positivos envolvidos e consoante os sinais sistémicos apresentados.

Os tratamentos consistiram na utilização de antibiótico parenteral e local, anti-inflamatório e, em casos mais graves de fluidoterapia. Em casos em que existia a suspeita de mastite por agentes gram-positivos os antibióticos parenterais utilizados eram: benzilpenicilina procaína e dihidroestreptomicina (Pendistrep[®], na dose de 12000 UI/kg de benzilpenicilina e 15 mg/kg de dihidroestreptomicina, por via intramuscular), penetamato (Mamyzin Parenteral[®], na dose de 15 mg/kg, por via intramuscular) ou amoxicilina e colistina. Os antibióticos intramamários utilizados foram: penicilina G procaína, penicilina G potássica, estreptomicina com hidrocortisona (Penicilina Mista[®]), penetamato, dihidroestreptomicina, framiketina com prednisolona (Mamyzin Injetor[®]), ou cefapirina e prednisolona (Mastiplan[®]). O anti-inflamatório utilizado foi flunixina meglumina. Em casos mais graves foi utilizada fluidoterapia, nomeadamente soro salino hipertónico e soro enriquecido em vitaminas, minerais e aminoácidos. No caso das mastites por agentes gram-negativos, o antibiótico sistémico utilizado era: marbofloxacina (Forcyl[®], na dose 10mg/kg, por via endovenosa), sendo que o antibiótico utilizado por via intramamária era

cefapirina e prednisolona. O anti-inflamatório utilizado foi meloxicam. Nos casos de suspeita de mastite por agentes gram-negativos foi sempre utilizada fluidoterapia devido ao risco de endotoxemia.

2.2.2.4.1. Avaliação de ordenha

Foram efetuados quatro serviços de acompanhamento de ordenha, onde o objetivo era: após a análise do contraste leiteiro (normalmente, de explorações com valores de CCS elevados) e assistência da ordenha, avaliar a rotina de ordenha, avaliar alguns animais e recolher amostras assépticas para posterior cultura e teste de sensibilidade aos antibióticos (TSA), de modo a encontrar possíveis problemas que pudessem ser corrigidos, melhorando o desempenho da exploração. Os procedimentos relacionados com os serviços de acompanhamento de ordenhas estão descritos na Tabela 9.

Tabela 9: Distribuição das intervenções efetuadas durante avaliações de ordenha, na AASM-CUA, em frequência absoluta (Fa) e relativa (Fr) (%) (n = 78).

| | | Local de estágio | |
|---------|---|------------------|--------|
| | | AASM-CUA | |
| Espécie | Procedimento | Fa | Fr (%) |
| Bovinos | Teste Californiano de Mastites (TCM) | 41 | 52,56 |
| | Recolhas assépticas de leite | 28 | 35,9 |
| | Reunião para entrega de relatório de avaliação de ordenha | 5 | 6,41 |
| | Serviço de acompanhamento de ordenhas | 4 | 5,13 |
| Total | | 78 | 100 |

Nos Açores a maioria das explorações possui os seus efetivos na pastagem durante todo o dia e nem todas as explorações possuem salas de ordenha fixas, Figura 13, pelo que muitas possuem máquinas de ordenha móveis, tal como a mostrada na da Figura 14. Deste modo, os relatórios efetuados, com o objetivo de melhorar a rotina de ordenha, devem ser executados individualmente avaliando as condições de cada exploração, de forma a obter-se um plano exequível.

Normalmente, os proprietários apresentavam uma lista de “vacas problema”. Eram consideradas “vacas problema” vacas com mastite clínica e vacas que apresentassem CCS altas durante mais do que dois contrastes leiteiros seguidos. A esses animais era feita uma recolha asséptica de uma amostra de leite do quarto que apresentasse elevada CCS, avaliado a partir do TCM.



Figura 13: Sala de ordenha fixa.



Figura 14: Máquina de ordenha móvel.

Nos Açores, as práticas de segregação, ou ordenha no final, de vacas com mastite ou que apresentem altos níveis individuais de CCS, estão bem implementadas, de forma a minimizar a CCS dos tanques, principalmente por razões económicas e legais (Azevedo *et al.*, 2016), sendo que, normalmente estes eram os animais avaliados.

Durante a assistência das ordenhas registavam-se todos os procedimentos executados pelos operadores, bem como todos os cuidados de higiene que os mesmos possuíam, como por exemplo, a utilização de luvas, ou a desinfecção de tetinas entre animais. Os animais são pontuados consoante a higiene do úbere, a limpeza da ponta do teto e a hiperqueratose do teto.

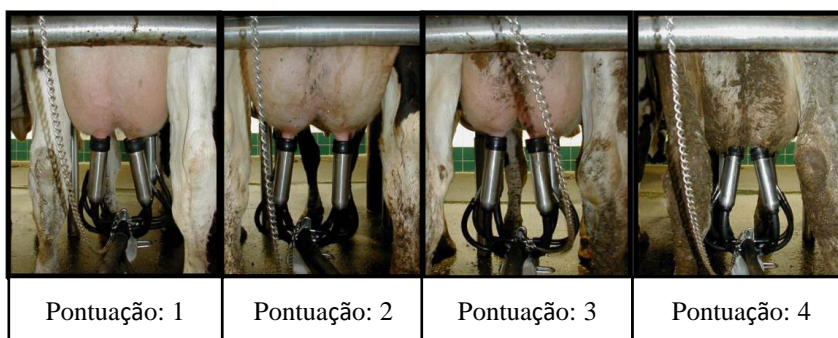


Figura 15: Escala de pontuação da higiene do úbere (Adaptado de Ruegg, 2002).

Na avaliação de higiene dos animais utilizava-se uma escala como a da Figura 15. Na pontuação um os animais encontravam-se livres de sujidade, na pontuação dois os animais encontravam-se levemente sujos, com cerca de 2 a 10% de superfície de área conspurcada, na pontuação três os animais encontravam-se moderadamente sujos, com cerca de 10 a 30% de área conspurcada e, por fim, na pontuação quatro os animais encontravam-se muito sujos, com mais de 30% da superfície conspurcada (Ruegg, 2002).

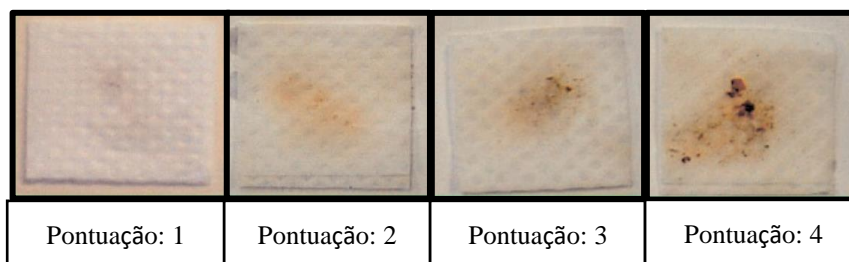


Figura 16: Escala de pontuação da limpeza da ponta do teto (Adaptado de WestfaliaSurge, 2006).

A pontuação da limpeza da extremidade do teto era feita após a higienização executada pelo ordenhador, imediatamente antes da colocação das tetinas, utilizando papel toalha, como está demonstrado na Figura 16. Na pontuação um os animais encontravam-se limpos, sem sujidade, estrume ou líquidos utilizados na higienização; na pontuação dois, os animais apresentavam líquidos sujos da sua higienização incorreta, não possuíam sujidade ou estrume; na pontuação três existia uma pequena quantidade de sujidade e estrume; por fim, na pontuação quatro existia uma grande quantidade de sujidade e estrume (WestfaliaSurge, 2006).

A omissão da limpeza do teto está relacionada com a contagem bacteriana total do leite (Gleeson *et al.*, 2016).



Figura 17: Escala de pontuação do grau de hiperqueratose do teto (Adaptado de Mein *et al.*, 2001.)

Por fim, era feita a pontuação da hiperqueratose da ponta do teto, como é demonstrado na escala da Figura 17. Na pontuação um a extremidade do teto encontrava-se normal sem anel em redor do orifício do canal do teto; na pontuação dois encontrava-se um anel elevado e liso ou ligeiramente áspero, sem folhas de queratina; na pontuação três encontrava-se um anel áspero, elevado, com folhas de queratina antigas isoladas, a partir do orifício, com um a três milímetros de tamanho; nesta categoria incluíam-se algumas falhas na integridade epitelial; por fim, na pontuação quatro, a extremidade do teto encontrava-se muito áspera com um anel elevado com folhas de queratina com mais de quatro milímetros, conferindo à extremidade do teto um aspeto “florido” (Mein *et al.*, 2001).

De seguida, executava-se a limpeza da ponta do teto utilizando álcool etílico a 96%, e era feita a recolha asséptica de uma amostra de leite, como está demonstrado nas Figura 18 e Figura 19.

Após a recolha, o material era transportado para o laboratório onde se procedia à identificação do agente e execução do TSA, como é demonstrado na Figura 20. Por fim, contactava-se o proprietário e aconselhava-se o tratamento mais adequado para os animais, consoante os resultados obtidos.

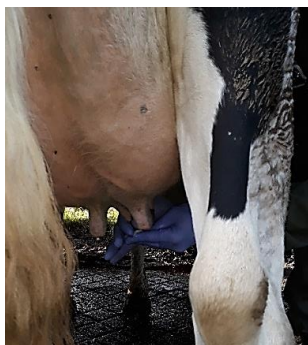


Figura 18: Limpeza da ponta do teto utilizando álcool etílico a 96%.

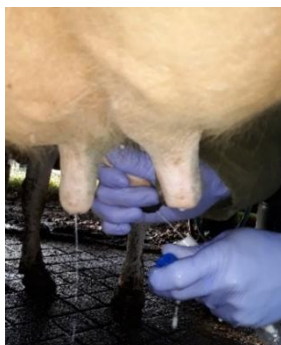


Figura 19: Recolha assética de amostra de leite.



Figura 20: Teste de sensibilidade aos antibióticos.

Assim, como é descrito numa revisão efetuada por Ashraf & Imran (2018), sobre o diagnóstico de mastites, para a obtenção de animais saudáveis devemos começar por executar um exame físico completo, identificando os sinais clínicos e alterações de comportamento, de seguida deve ser feito um teste de identificação de mastite, como TCM ou CCS, e identificado o agente patogénico, de modo a alcançar um tratamento adequado às mastites.

Segundo um estudo de Kuipers *et al.* (2016) os principais motivos de utilização de antibióticos são a manutenção e a restauração da saúde do úbere, sendo que o uso de antibióticos na produção animal é responsável por contribuir para o aumento da resistência bacteriana aos antibióticos em humanos. Assim sendo, a realização de TSA permite-nos realizar um tratamento de forma consciente e direcionada ao agente em causa. Por outro lado, a diminuição da incidência da doença (através do controlo de novas infeções) leva-nos a uma diminuição da utilização de antibióticos (Krömker & Leimbach, 2017), pelo que a avaliação de ordenhas e consciencialização dos ordenhadores através da entrega de relatórios com normas a seguir é um processo de extrema importância.

2.2.2.5. Sistema Metabólico

Na Tabela 10 observa-se uma maior incidência de casos de hipocalcemia (45,83%) e de cetose (50%), pelo que serão os casos abordados, sendo casos referentes à AASM-CUA.

As doenças referidas são doenças comuns do pós-parto de bovinos de aptidão leiteira, pelo que o produtor está alertado para tal, sendo que muitos deles já atuam de forma preventiva.

Tabela 10: Distribuição dos casos de clínica médica referentes ao sistema metabólico, consoante local de estágio e espécie, em frequência absoluta (Fa) e relativa (Fr) (%) (n = 24).

| Espécie | Diagnóstico | Local de estágio | | | | | |
|---------|---------------------|------------------|--------|-------|--------|-------|--------|
| | | AASM-CUA | | VetAI | | Total | |
| | | Fa | Fr (%) | Fa | Fr (%) | Fa | Fr (%) |
| Bovinos | Hipocalcemia | 11 | 47,83 | 0 | 0,00 | 11 | 45,83 |
| | Cetose clínica | 9 | 39,13 | 0 | 0,00 | 9 | 37,50 |
| | Cetose sub-clínica | 3 | 13,04 | 0 | 0,00 | 3 | 12,50 |
| Ovinos | Toxemia de gestação | 0 | 0,00 | 1 | 100,00 | 1 | 4,17 |
| | Total | 23 | 100 | 1 | 100 | 24 | 100 |

O decúbito em animais de aptidão leiteira é geralmente causado por hipocalcemia, no entanto, outras causas podem estar na sua origem, tais como: hipomagnesemia, lesão musculoesquelética, cetose, hipofosfatemia, mastite, ou outras infeções (DeGaris & Lean, 2008).

A hipocalcemia é um distúrbio metabólico comum em vacas leiteiras, que leva a um risco aumentado do aparecimento de outras doenças, tais como: RMF, metrite, mastite, cetose, deslocamento de abomaso e prolapso uterino, podendo ser fatal (DeGaris & Lean, 2008; Venjakob *et al.*, 2017; Venjakob *et al.*, 2018). Alguns estudos demonstram que os distúrbios do periparto, como os anteriormente referidos, não atuam totalmente de forma independente, relacionando-se entre si. A hipocalcemia resulta de um aumento repentino dos requisitos de cálcio para a produção de colostro e leite (Chiwome *et al.*, 2017). Fisiologicamente, a concentração sérica de cálcio na vaca adulta é superior a 2 mmol/L (Venjakob *et al.*, 2017). A homeostase do cálcio é regulada pela calcitonina, hormona da paratiroide e vitamina D [1,25(OH)₂Vitamina D₃] (DeGaris & Lean, 2008). Existem evidências de que o risco de hipocalcemia aumenta com o número de lactações do animal e a sua produção de leite (Chiwome *et al.*, 2017)

O diagnóstico de hipocalcemia baseia-se numa anamnese completa e observação de sinais clínicos, tais como: ataxia progressiva, depressão, desidratação, anorexia, decúbito esternal que culmina em decúbito lateral, perda de consciência, podendo levar à morte (Chiwome *et al.*, 2017). A Figura 21, mostra uma vaca caída com hipocalcemia.

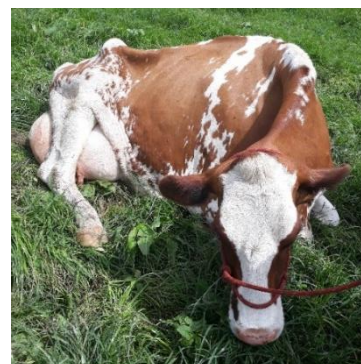


Figura 21: Vaca caída com hipocalcemia.

O tratamento efetuado a animais com hipocalcemia consistiu na administração oral de cálcio (Bovisal Pearls CaP®), gluconato de cálcio (Solução de cálcio Braun®) por via endovenosa e gluconato de cálcio monohidratado, borogluconato de cálcio e cloreto de magnésio (TAT CALCI 50®) por via subcutânea.

A cetose é um distúrbio metabólico comum em bovinos de aptidão leiteira, marcado pelo aumento dos níveis de corpos cetónicos (acetona, acetoacetato e β-hidroxibutirato) em

circulação (Garzón-Audor *et al.*, 2019). A hipercetonemia é desenvolvida por animais que não se adaptem corretamente ao balanço energético negativo durante o período de transição. Neste mesmo período a gordura corporal está a ser mobilizada para a produção de energia, de modo a apoiar a produção de leite, levando a uma mobilização acentuada de lípidos e um aumento da circulação de ácidos gordos não esterificados e de corpos cetónicos nos tecidos e no leite (Jeong *et al.*, 2018).

Os sinais clínicos descritos são: cheiro a acetona na respiração, atividade reduzida, diminuição na ingestão de alimento, perda excessiva de condição corporal, diminuição na produção de leite, fraqueza e aparente cegueira (Benedet *et al.*, 2019). Na cetose nervosa a vaca apresenta o pescoço permanentemente levantado e esticado, exhibe comportamentos anormais, como morder barras ou manjedouras, mostra incoordenação e inquietude (Stilwell, 2013). Um dos casos de cetose clínica observados tratou-se de cetose nervosa.

O diagnóstico de cetose é feito a partir da medição de corpos cetónicas. Podem ser utilizados aparelhos que detetam o β -hidroxibutirato no sangue, sendo que com valores compreendidos entre 1,4 e 2,5 mmol/L considera-se cetose subclínica e valores superiores a 2,5 mmol/L considera-se cetose clínica (Stilwell, 2013). Podem também utilizar-se fitas para a medição de β -hidroxibutirato no leite, como mostrado na Figura 22.



Figura 22: Fitas para medição de corpos cetónicos no leite.

O tratamento efetuado consistiu na administração de fluidoterapia endovenosa com glucose a 30% e soro enriquecido em vitaminas, minerais e aminoácidos e propilenoglicol oral. Foi também administrada dexametasona aos animais (Dexafarma Retard 2mg/mL[®]).

2.2.2.6. Sistema Musculoesquelético

Os casos observados mais frequentemente neste sistema foram as claudicações (37,84%), sendo que, apesar das doenças podais afetarem mais frequentemente bovinos de aptidão leiteira mantidos em regime intensivo, encontram-se muito frequentemente também nos outros tipos de produção.

De seguida, o caso mais observado consiste na síndrome de vaca caída após o parto (21,62%), como se observa na Tabela 11.

Tabela 11: Distribuição dos casos de clínica médica referentes ao sistema musculoesquelético, consoante local de estágio e espécie, em frequência absoluta (Fa) e relativa (Fr) (%) (n = 37).

| Espécie | Diagnóstico | Local de estágio | | | | | |
|---------|-------------------------|------------------|--------|-------|--------|-------|--------|
| | | AASM-CUA | | VetAI | | Total | |
| | | Fa | Fr (%) | Fa | Fr (%) | Fa | Fr (%) |
| Bovinos | Claudicação | 7 | 36,84 | 7 | 38,89 | 14 | 37,84 |
| | Síndrome de vaca caída | 3 | 15,79 | 5 | 27,78 | 8 | 21,62 |
| | Poliartrite séptica | 4 | 21,05 | 1 | 5,56 | 5 | 13,51 |
| | Fratura óssea | 1 | 5,26 | 1 | 5,56 | 2 | 5,41 |
| | Laceração | 2 | 10,53 | 0 | 0,00 | 2 | 5,41 |
| | Luxação coxofemoral | 1 | 5,26 | 0 | 0,00 | 1 | 2,70 |
| | Luxação escapulo-umeral | 0 | 0,00 | 1 | 5,56 | 1 | 2,70 |
| | Lesão do nervo tibial | 1 | 5,26 | 0 | 0,00 | 1 | 2,70 |
| Ovinos | Claudicação | 0 | 0 | 3 | 16,67 | 3 | 8,11 |
| | Total | 19 | 100 | 18 | 100 | 37 | 100 |

As claudicações em bovinos afetam significativamente a produção e o bem-estar dos animais (Weaver *et al.*, 2018). As doenças podais são responsáveis por cerca de 90% das claudicações em bovinos leiteiros, e cerca de 70% em animais de engorda (Newcomer & Chamorro, 2016). Nas vacas de caráter leiteiro as doenças e lesões podais surgem essencialmente nos membros posteriores e, nestes, principalmente nas úngulas laterais, enquanto nos membros anteriores as lesões ocorrem fundamentalmente nas úngulas mediais. Numa exploração é importante a contabilização dos animais com lesões, bem como o tipo de lesões que existem, sendo que os fatores predisponentes ao aparecimento de lesões são: piso, camas e cubículos, alimentação, parto, manejo, comportamento e falta de aparagem corretiva; ao avaliar-se as lesões dos animais consegue fazer-se uma avaliação da exploração (Stilwell, 2013).

As claudicações, podendo ser de origem infecciosa ou não infecciosa, podem ter origem em diversas lesões, tais como: laminite, úlcera de sola, doença da linha branca, úlcera e abcesso da pinça, falsa sola ou dupla sola, fissuras, erosão do bulbo, panarício interdigital, dermatite digital e interdigital, tiloma, artrite interfalângica, abcesso podal, artropatias, bursite e celulite, osteomielite, fraturas, luxações e ruturas musculares, miosite infecciosa, paresia espástica, entre outros (Stilwell, 2013; Newcomer & Chamorro, 2016).

Na AASM-CUA existe um serviço de podologia bovina, pelo que o médico veterinário apenas realizava um tratamento sintomático e não efetuava corte de úngulas. Deste modo, o tratamento foi feito apenas utilizando anti-inflamatório, normalmente flunixinina meglumina, e antibioterapia, oxitetraciclina.

Como foi referido anteriormente, no ponto 2.2.2.5., a síndrome de vaca caída é uma afeição multifatorial, sendo o bloqueio de vitelos de grandes dimensões no canal obstétrico, por elevados períodos de tempo, por distócia, uma das causas etiológicas desta síndrome, uma vez que leva à compressão, com paralisia, ou mesmo secção dos ramos do nervo ciático ou nervo obturador.

A lesão do nervo ciático, ou dos seus ramos (nervo tibial e peroneal), são a lesão nervosa periférica mais comum. O nervo ciático provém das raízes nervosas L6-S2, innervando a zona da bacia, coxa e soldra e, ainda, inclui fibras do nervo tibial e do nervo peroneal. Os sinais clínicos da lesão do nervo ciático são variáveis e dependem do tipo de lesão, sendo que durante o decúbito os membros podem estar estendidos ao longo do corpo. O nervo obturador surge das raízes nervosas L4-L6, sendo responsável pela adução do



Figura 23: Vaca caída com lesão dos nervos ciático e obturador.

membro pélvico. Em caso de lesão do nervo obturador os animais encontram-se em decúbito com os membros perpendicularmente ao corpo da vaca (Hartnack, 2017; Stilwell, 2013).

Lesões dos dois nervos são habituais e nesses casos os sinais são mistos, como se pode observar na Figura 23.

O tratamento efetuado a estes animais consistiu na administração de dexametasona e vitaminas do complexo B (Bê-Complex[®], na dose de 15 ml por animal, por via intramuscular), bem como levantar o animal utilizando uma “pinça de ancas” sempre que possível. Caso existam outras complicações associadas, como RMF, metrites ou mastites devem ser tratadas de forma adequada.

2.2.2.7. Pele e Anexos

O caso mais observado foi fotossensibilização secundária (40%), como se observa na Tabela 12, uma vez que é uma doença comum nos Açores, devido à presença do fungo *Pithomyces chartarum* e de boas condições climáticas para o seu desenvolvimento.

Tabela 12: Distribuição dos casos de clínica médica referentes a afeções da pele e anexos, consoante local de estágio e espécie, em frequência absoluta (Fa) e relativa (Fr) (%) (n = 10).

| Espécie | Dignóstico | Local de estágio | | | | | |
|---------|--|------------------|--------|-------|--------|-------|--------|
| | | AASM-CUA | | VetAI | | Total | |
| | | Fa | Fr (%) | Fa | Fr (%) | Fa | Fr (%) |
| Bovinos | Fotossensibilização secundária | 4 | 50,00 | 0 | 0,00 | 4 | 40,00 |
| | Carcinoma da terceira pálpebra | 1 | 12,50 | 0 | 0,00 | 1 | 10,00 |
| | Fibropapilomas cutâneos | 1 | 12,50 | 0 | 0,00 | 1 | 10,00 |
| | Lacerações causadas por ataque de carnívoros | 0 | 0,00 | 1 | 50,00 | 1 | 10,00 |
| | Hematoma | 1 | 12,50 | 0 | 0,00 | 1 | 10,00 |
| | Míiase | 0 | 0,00 | 1 | 50,00 | 1 | 10,00 |
| | Sarna | 1 | 12,50 | 0 | 0,00 | 1 | 10,00 |
| Total | 8 | 100 | 2 | 100 | 10 | 100 | |

A fotossensibilização secundária resulta de insuficiência hepática causada por toxinas levando à obstrução biliar e retenção de filoteritina. Uma das toxinas mais comuns é a esporidesmina do fungo *Pithomyces chartarum* (Stilwell, 2013). A esporidesmina causa pericolangite e oclusão dos ductos biliares, resultando na diminuição da excreção de filoteritina, metabolito fotodinâmico produzido pela degradação microbiana da clorofila no rúmen. Os animais afetados têm altos níveis plasmáticos de filoteritina e tornam-se sensíveis à luz solar, especialmente em zonas mais expostas e não pigmentadas da pele, como se pode observar na Figura 24. Os primeiros sinais



Figura 24: Lesão de fotossensibilização secundária.

de intoxicação podem ser diarreia transitória e inapetência logo após os animais serem expostos à toxina, e uma redução da produção de leite. De seguida, aparecem os sinais de fotossensibilização, existindo um período latente de 10 a 14 dias; normalmente os primeiros sinais digestivos não são reconhecidos pelo produtor, sendo que as lesões cutâneas aparecem quando o dano hepático já é grave (Pinto *et al.*, 2005). A distribuição das lesões é patognomónica (Stilwell, 2013). O tratamento consistia na administração de anti-inflamatório, flunixinina meglumina, administração de vitaminas do complexo B, e aconselhamento do produtor em colocar óleo de fígado de bacalhau nas lesões, para promover a hidratação.

O papilomavírus bovino (BPV) é o agente etiológico da papilomatose bovina, uma doença infecciosa, caracterizada pela presença de lesões hiperproliferativas, papilomas, como se pode observar na Figura 25, que regridem espontaneamente ou persistem e evoluem para a malignidade. Embora afete preferencialmente bovinos jovens, a doença pode afetar animais de todas as idades. Atualmente são descritos 15 tipos de BPV (Araldi *et al.*, 2017). O tratamento efetuado consistiu em auto-hemoterapia, injetando cerca de 20 mL de sangue do próprio animal por via intramuscular.



Figura 25: Fibropapilomas cutâneos no membro anterior direito de vitelo.

2.2.2.8. Outros

Neste ponto refere-se a casos clínicos referentes a diversos sistemas independentes, dos quais existiam poucos casos para os referir isoladamente. Fala-se essencialmente da queratoconjuntivite infecciosa bovina (QQIB) uma vez que foi o caso observado em maior frequência (53,85%), como está na Tabela 13.

Tabela 13: Distribuição dos casos clínicos de outros sistemas, consoante local de estágio e espécie, em frequência absoluta (Fa) e relativa (Fr) (%) (n = 26).

| Espécie | Diagnóstico | Local de estágio | | | | | |
|---------|--|------------------|--------|-------|--------|-------|--------|
| | | AASM-CUA | | VetAI | | Total | |
| | | Fa | Fr (%) | Fa | Fr (%) | Fa | Fr (%) |
| Bovinos | Queratoconjuntivite infecciosa bovina (QQIB) | 14 | 70,00 | 0 | 0,00 | 14 | 53,85 |
| | Suspeita de cardiopatia | 2 | 10,00 | 2 | 33,33 | 4 | 15,38 |
| | Peritonite | 2 | 10,00 | 0 | 0,00 | 2 | 7,69 |
| | Hemorragia interna | 0 | 0,00 | 1 | 16,67 | 1 | 3,85 |
| | Meningite | 1 | 5,00 | 0 | 0,00 | 1 | 3,85 |
| | Suspeita de hipomagnesiemia | 1 | 5,00 | 0 | 0,00 | 1 | 3,85 |
| Ovinos | Queratoconjuntivite infecciosa | 0 | 0,00 | 2 | 33,33 | 2 | 7,69 |
| | Sintomatologia nervosa (rebanho) | 0 | 0,00 | 1 | 16,67 | 1 | 3,85 |
| Total | | 20 | 100 | 6 | 100 | 26 | 100 |

A QQIB é a doença ocular mais comum em bovinos, apresentando uma distribuição mundial (Eddy *et al.*, 2004; Angelos, 2015). A QQIB possui uma baixa mortalidade, mas pode levar a elevados prejuízos económicos, não só devido às lesões causadas, mas também devido aos custos de tratamento (Ely *et al.*, 2019; Loy *et al.*, 2018). Os sinais clínicos comuns são: lacrimejamento, fotofobia, edema ocular, dor ocular e úlcera da córnea, podendo levar à cegueira

(Cullen *et al.*, 2016). O principal agente etiológico é *Moraxella bovis*, um coco-bacilo gram-negativo, no entanto, já foram encontrados outros agentes causadores da doença, nomeadamente: *Moraxella bovoculi*, *Moraxella ovis*, *Mycoplasma* spp. ou herpesvírus tipo 1 (BHV-1) (Postma *et al.*, 2008; Angelos, 2015; Kowalski *et al.*, 2017). A patogenicidade da *Moraxella bovis* requer a expressão de proteínas presentes nas fímbrias, para que ocorra a sua fixação à superfície ocular e de uma citotoxina que danifica as células epiteliais da córnea. É uma doença com uma elevada contagiosidade, sendo a sua transmissão influenciada por diferentes fatores, tanto ambientais como do próprio animal, tais como: raça, idade, estado imunitário, exposição a raios ultravioleta, exposição a moscas, entre outros. A transmissão ocorre por contacto direto, através de corrimentos nasais e oculares de animais infetados, através da utilização de fomites, e mais frequentemente, através de vetores mecânicos, nomeadamente moscas dos géneros *Musca* e *Stomoxys* (Eddy *et al.*, 2004; Postma *et al.*, 2008; Angelos, 2015)

O tratamento foi feito recorrendo a penicilina G procaína com dihidroestreptomicina (Sorobiotico®) e dexametasona (Vetacort®) via subconjuntival, sendo que a dose utilizada dependia do tamanho do animal, em vitelos, 5 mL de penicilina G procaína com dihidroestreptomicina e 1 mL de dexametasona (desde que não existisse úlcera córnea). Foram feitas administrações subconjuntivais, uma vez que deste modo mantêm-se concentrações mais altas de fármacos na córnea durante um maior período de tempo, do que com aplicações sistémicas ou parentéricas (Senturk *et al.*, 2007). O tratamento era feito uma única vez, sendo que, após o tratamento os animais ficam impossibilitados de abrir o olho, durante um período de cerca de uma semana, ficando assim o olho protegido de possíveis agressões externas. Nem sempre o tratamento é feito atempadamente, pelo que alguns animais não recuperam totalmente a visão, como é visível na Figura 26.



Figura 26: Cicatriz na córnea de queratoconjuntivite infecciosa bovina.

2.2.3. Clínica Cirúrgica

Dentro da clínica cirúrgica destacam-se em maior frequência os casos de drenagem de abscessos (25,42%), descorna (22,03%) e deslocamento de abomaso à esquerda (DAE) (16,95%), como se observa na Tabela 14.

Tabela 14: Distribuição dos casos de clínica cirúrgica, consoante local de estágio e espécie, em frequência absoluta (Fa) e relativa (Fr) (%) (n = 59).

| Espécie | Procedimento | Local de estágio | | | | | |
|----------|---|------------------|--------|-------|--------|-------|--------|
| | | AASM-CUA | | VetAI | | Total | |
| | | Fa | Fr (%) | Fa | Fr (%) | Fa | Fr (%) |
| Bovinos | Drenagem de abscesso | 9 | 36,00 | 6 | 17,65 | 15 | 25,42 |
| | Descorna cirúrgica em vitelos | 0 | 0,00 | 13 | 38,24 | 13 | 22,03 |
| | Resolução de deslocamento de abomaso à esquerda (DAE) | 10 | 40,00 | 0 | 0,00 | 10 | 16,95 |
| | Episiotomia | 0 | 0,00 | 5 | 14,71 | 5 | 8,47 |
| | Cesariana | 1 | 4,00 | 3 | 8,82 | 4 | 6,78 |
| | Descorna cirúrgica em adultos | 0 | 0,00 | 2 | 5,88 | 2 | 3,39 |
| | Exérese de carcinoma da terceira pálpebra | 2 | 8,00 | 0 | 0,00 | 2 | 3,39 |
| | Resolução deslocamento de abomaso à direita (DAD) | 2 | 8,00 | 0 | 0,00 | 2 | 3,39 |
| | Resolução de prolapso uterino | 0 | 0,00 | 2 | 5,88 | 2 | 3,39 |
| | Resolução de prolapso vaginal | 0 | 0,00 | 2 | 5,88 | 2 | 3,39 |
| | Sutura de ferida | 1 | 4,00 | 0 | 0,00 | 1 | 1,69 |
| Caprinos | Resolução de prolapso vaginal | 0 | 0,00 | 1 | 2,94 | 1 | 1,69 |
| | Total | 25 | 100 | 34 | 100 | 59 | 100 |

O deslocamento de abomaso é caracterizado pela alteração da posição anatómica do abomaso, que possui uma apresentação na região ventral direita do abdómen. O deslocamento pode ocorrer para o lado direito ou esquerdo, sendo o último mais frequente (Caixeta *et al.*, 2018).

O DAE é um distúrbio multifatorial diagnosticado quase exclusivamente em vacas leiteiras, ocorrendo frequentemente e levando a elevados prejuízos económicos, devido não só aos custos veterinários mas também devido à diminuição da produção de leite, da fertilidade, e consequentemente, ao abate prematuro; o seu controlo e prevenção varia entre explorações (Sexton *et al.*, 2007; Mueller, 2011; Caixeta *et al.*, 2018; Lehner *et al.*, 2018).

A prevalência do aparecimento de DAE é variável, sendo que existe uma incidência crescente devido ao aumento da produção média de leite, em vacas com maior mérito genético e que possuam um manejo nutricional inadequado (Sexton *et al.*, 2007).

Os fatores predisponentes para que ocorra um deslocamento de abomaso são: hipomotilidade e hipotonicidade; sendo que, existem diversos fatores de risco que direta ou indiretamente levam ao aparecimento destas condições, nomeadamente: alterações na parede do abomaso, concentração dos ácidos gordos voláteis, quantidade de fibra ingerida, nutrição no início do período seco, nutrição no período de transição, alimentação com alimentos concentrados no pós-parto, fatores hormonais, hipocalcemia, compromisso da função renal,

mastite, produção de leite, problemas do trato reprodutivo, altura do ano, entre outros fatores (Mueller, 2011; Weaver *et al.*, 2018).

O deslocamento de abomaso é frequentemente uma seqüela de outras doenças comuns do período de transição (Caixeta *et al.*, 2018). Após o parto, existe um aumento do espaço vazio no abdômen, espaço este que também tem sido aumentado com a utilização das “vacas leiteiras modernas”, que apresentam uma profundidade abdominal superior; existe uma diminuição da ingestão de matéria seca, que em conjunto com a mobilização lipídica (estimulada pela limitação de ingestão no pré-parto), bem como o aumento da ingestão de alimento concentrado levam ao aparecimento de cetose; a cetose, em conjunto com a hipocalcemia, leva a uma diminuição da mobilidade do abomaso, bem como, caso surja, alguma endotoxemia; uma vez que ocorre uma diminuição da ingestão de fibra e um aumento da ingestão de alimento concentrado, há um aumento na produção de ácidos gordos voláteis, ocorre uma acidose ruminal, levando à hipomotilidade do abomaso e à acumulação excessiva de gás, favorecendo então o órgão a deslocar-se do assoalho abdominal para a parede abdominal esquerda (Megumi *et al.*, 2017; Caixeta *et al.*, 2018; Lehner *et al.*, 2018).

O diagnóstico de DAE deve ser feito de uma forma precisa e precoce para evitar que existam adesões e que ocorra uma redução na produção leiteira. O diagnóstico tradicional é feito através da auscultação e simultânea percussão da região do flanco esquerdo e entre as 10^a-13^a costelas, ouvindo-se um som metálico agudo – *ping* – (Li *et al.*, 2018; Weaver *et al.*, 2018).

Deve-se ter em atenção os diagnósticos diferenciais para o respetivo som audível após a percussão do flanco esquerdo, nomeadamente: síndrome de colapso do rúmen, timpanismo ruminal, peritonite ou pneumoperitoneu (Mueller, 2011).

Normalmente, os sinais clínicos referidos pelos detentores dos animais são os seguintes: produção de leite insatisfatória, inapetência seletiva, existe uma ingestão de forragem mas refuta o alimento concentrado, perda de condição corporal, e uma possível história pregressa de distocia, hipocalcemia, metrite ou mastite (Mueller, 2011; Weaver *et al.*, 2018).

O tratamento pode ser feito através de técnicas conservativas ou de cirurgia. Nos casos acompanhados, utilizou-se a técnica cirúrgica de

Utrecht, demonstrada na Figura 27, onde era feita uma incisão no flanco esquerdo, colocada uma sutura encadeada na curvatura maior do abomaso e de seguida era fixada no abdômen na localização anatómica do abomaso.

Na Figura 28 estão demonstrados os diversos procedimentos das cirurgias corretivas de DAE efetuadas.

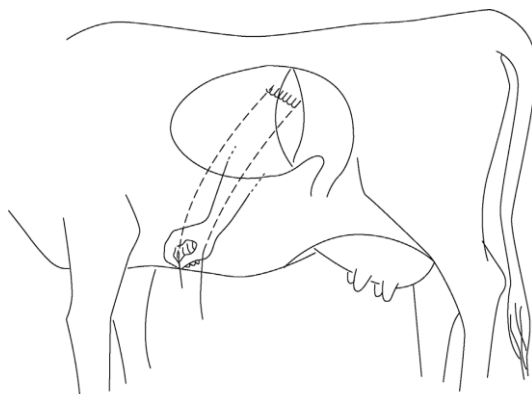


Figura 27: Abomasopexia pelo lado esquerdo utilizando o método de Utrecht (Adaptado de Weaver *et al.*, 2018).

Em primeiro lugar era feita a limpeza e tricotomia da zona do flanco esquerdo. Existem diferentes técnicas para fazer uma anestesia regional na zona do flanco, nomeadamente: bloqueio paravertebral, bloqueio linear, bloqueio em “T” e bloqueio em “L” invertido (Weaver *et al.*, 2018). Nas cirurgias assistidas era efetuado um bloqueio em “L” invertido utilizando 100 mL de lidocaína (Anestésin[®]) para todo o bloqueio. Após a anestesia regional era feita a assepsia utilizando iodopovidona (Betadine[®]). O corte era feito com o menor comprimento possível, para evitar possíveis complicações e facilitar a sua cicatrização, no centro da fossa paralombar esquerda, incidindo a pele, músculos oblíquo externo, oblíquo interno e transversos e peritônio. Algumas das possíveis complicações são: incapacidade de colocar o abomaso na sua posição normal, aderências do abomaso à parede abdominal, incapacidade de localizar o piloro e peritonite (Weaver *et al.*, 2018). Como já foi referido após a localização do abomaso e da sua curvatura maior era feita uma sutura encadeada para uma posterior fixação na sua posição anatómica, utilizando fio não absorvível (Supramid[®]) de 7 USP. Normalmente, não era perfurado o abomaso com o objetivo de retirar algum gás, quando o abomaso era empurrado para a sua posição fisiológica esse gás era encaminhado para o intestino. Por fim, o peritônio era suturado em simultâneo com o músculo transversos, utilizava-se fio absorvível (Catgut Chrom[®]) de 5 USP, de seguida os músculos oblíquo interno e externo eram suturados em simultâneo, com o mesmo tipo de fio, e por fim, a pele, era utilizado fio não absorvível de 7 USP, todas as camadas eram suturadas com suturas simples contínuas. Para prevenção de peritonite era utilizada penicilina G procaína com dihidroestreptomicina intraperitoneal, na dose 30000 UI/kg. Pode surgir peritonite, sempre que ocorra alguma quebra na assepsia, sendo que os sinais clínicos precoces são: dor, piroxia (cerca de 40,5°C), taquicardia, anorexia, redução da atividade ruminorreticular, nos casos agudos; o diagnóstico era feito através de auscultação e percussão, ouvindo-se um som metálico difuso (Weaver *et al.*, 2018). Em casos de peritonite foram administrados um litro de soro salino hipertónico e um soro rico em vitaminas e aminoácidos, era administrado anti-inflamatório não esteróide, flunixin meglumina, na dose de 3,3 mg/kg, oxitetraciclina e dexametasona (Dexacortin[®]) intraperitoneal. Em casos de deslocamento de abomaso, o anti-inflamatório utilizado foi flunixin meglumina (Finadyne[®] ou Finadyne Transdermal[®]), nas doses 2,2 mg/kg, endovenoso, ou 3,3 mg/kg, transdérmico, respetivamente. Foi também administrado por rotina um soro vitamínico e um litro de soro salino hipertónico.

É importante referir que os animais não eram sedados sendo que apenas lhes era passada uma corda na zona dos curvilhões. Em casos de doenças concomitantes, ou possíveis complicações, foram adicionados outros tratamentos, ou foram feitas alterações neste tratamento padrão.



Figura 28: Técnica cirúrgica em DAE. A - Limpeza utilizando sabão; B - Tricotomia; C - Anestesia local (L invertido); D - Corte; E - Visualização do abomaso (seta amarela); F - Fixação do abomaso; G - Nó após fixação de abomaso; H - Sutura das camadas internas; I - Sutura da pele.

A descorna é um processo de extrema importância que pode aumentar o bem-estar animal, diminuindo os conflitos entre animais e evitando lesões dos cornos, como se pode observar na Figura 2929. No entanto, a descorna deve ser um processo ponderado e efetuado o mais cedo possível. A descorna em vitelos trata-se de um processo com menores riscos, maior facilidade de execução e menores custos, de forma ideal pode ser efetuado utilizando um termocautério, de forma a queimar o tecido produtor de substância córnea na base do corno, como se pode observar na Figura 30, em contra partida, a descorna cirúrgica em animais adultos é um processo de elevados riscos, com elevada possibilidade de hemorragia e infeção, como se observa na Figura31.



Figura 29: Lesão traumática em corno de touro charolês.



Figura 30: Descorna em vitelo utilizando termocautério.



Figura 31: Descorna cirúrgica em animal adulto.

Foram também observados dois casos de prolapso vaginal, Figura 31, e dois casos de prolapso uterino, Figura 32. Todos os casos foram resolvidos recorrendo a sutura de *Buhner*, Figura 33. Em primeiro lugar, fez-se a lavagem com clorexidina da zona perivulvar e da vagina ou útero, colocou-se ocitocina no útero, para promover a sua contração, de seguida colocou-se cuidadosamente a vagina / útero na sua posição anatómica, voltou-se a fazer uma lavagem da zona perivulvar, inseriu-se a agulha de *Buhner* cerca de 3 cm ventral à comissura vulvar de modo a emergir dorsalmente à vulva, utilizou-se cerca de 45 cm de banda vaginal, repetiu-se o processo do outro lado de modo a que as pontas da banda vaginal ficassem ventrais, por fim, fez-se um nó com as pontas da banda vaginal de modo a que ficasse com o espaço de 3 dedos no lúmen vulvar (Weaver *et al.*, 2018).



Figura 31: Vaca com prolapso vaginal.



Figura 32: Vaca com prolapso uterino.



Figura 33: Sutura de Buhner.

2.2.4. Exames de diagnóstico

Os exames de diagnóstico referidos na Tabela 15, consistem apenas nos exames realizados nas instalações da VetAI, ou exames assistidos no âmbito do estágio, todos os exames laboratoriais enviados para laboratórios externos não são referidos.

Tabela 15: Distribuição dos exames de diagnóstico, efetuados na VetAI, consoante espécie, em frequência absoluta (Fa) e relativa (Fr) (%) (n = 15)

| Espécie | Procedimento | Local de estágio | |
|-------------------|-----------------------------------|------------------|--------|
| | | Fa | Fr (%) |
| Bovinos | Coprologia parasitária | 3 | 20,00 |
| | Necropsia | 3 | 20,00 |
| | Teste rápido de diarreias | 2 | 13,33 |
| | Hemograma | 1 | 6,67 |
| Ovinos | Necropsia | 4 | 26,67 |
| Caprinos | Coprologia parasitária de rebanho | 1 | 6,67 |
| Ovinos e Caprinos | Coprologia parasitária de rebanho | 1 | 6,67 |
| | Total | 15 | 100 |

A necropsia, ou exame *post mortem*, possui especial importância uma vez que, em muitos casos, confere a possibilidade de obter informações sobre a causa de morte dos animais. A necropsia consiste num conjunto de observações e de exames que se realizam ao cadáver do animal, sendo que esta deve ser efetuada de forma metódica e completa. Quando se efetua uma necropsia nem sempre se chega a um diagnóstico, uma vez que podemos chegar aos seguintes pontos: as lesões macroscópicas são suficientemente esclarecedores e não se necessita de outros exames complementares; as alterações macroscópicas necessitam de ser esclarecidas; as alterações macroscópicas não são interpretáveis pelo executante (Silva *et al.*, 2016). Deste modo, os exames complementares demonstram especial importância, no entanto, a sua realização deve ser ponderada uma vez que muitos deles possuem elevados custos monetários, podendo levar a resultados inconclusivos. Assim a necropsia possui um papel muito relevante, uma vez que se trata de uma tarefa com baixos custos monetários.

2.2.5. Controlo reprodutivo

Os procedimentos de assistência reprodutiva, Tabela 16 acompanhados na AASM-CUA ocorreram nos dias em que foi seguido um dos médicos veterinários responsáveis pelos serviços de reprodução efetuada pela AASM-CUA, uma vez que os serviços se encontram repartidos.

A assistência reprodutiva efetuada em maior número trata-se do diagnóstico de gestação por ecografia em ovinos (36,08%).

Na VetAI foram também efetuados exames andrológicos (1,83%). Nos efetivos em extensivo de aptidão creatopoiética o macho apresenta um papel muito relevante, sendo que o estado reprodutivo do efetivo depende em grande peso dos machos, ao contrário do que acontece com os efetivos de aptidão leiteira na ilha de São Miguel, uma vez que muitos produtores recorrem a inseminação artificial.

Um dos principais problemas encontrados tanto na ilha de São Miguel, como no Alentejo, foi a falta de registos sobre os animais das explorações, a ausência de registo de partos, de dias de lactação, de dias entre o parto e a conceção, dados importantes para que ocorra uma boa gestão reprodutiva da exploração.

Tabela 16: Distribuição das intervenções de controlo reprodutivo, consoante local de estágio e espécie, em frequência absoluta (Fa) e relativa (Fr) (%) (n = 873).

| Espécie | Procedimento | Local de estágio | | | | | |
|------------------|---|------------------|--------|-------|--------|-------|--------|
| | | AASM-CUA | | VetAI | | Total | |
| | | Fa | Fr (%) | Fa | Fr (%) | Fa | Fr (%) |
| Bovinos | Diagnóstico de gestação por ecografia | 0 | 0,00 | 211 | 37,02 | 211 | 24,17 |
| | Diagnóstico de gestação por palpação transretal | 197 | 65,02 | 0 | 0,00 | 197 | 22,57 |
| | Avaliação da atividade ovárica | 39 | 12,87 | 27 | 4,74 | 66 | 7,56 |
| | Avaliação de útero pós-parto | 62 | 20,46 | 0 | 0,00 | 62 | 7,10 |
| | Exame andrológico | 0 | 0,00 | 16 | 2,81 | 16 | 1,83 |
| | Palpação pré-parto | 2 | 0,66 | 1 | 0,18 | 3 | 0,34 |
| | Colocação de PRID® | 2 | 0,66 | 0 | 0,00 | 2 | 0,23 |
| Indução de parto | 1 | 0,33 | 0 | 0,00 | 1 | 0,11 | |
| Ovinos | Diagnóstico de gestação por ecografia | 0 | 0,00 | 315 | 55,26 | 315 | 36,08 |
| Total | | 303 | 100 | 570 | 100 | 873 | 100 |

Teoricamente, nos bovinos, é possível identificar o *conceptus* por ultrassonografia a partir do 21º dia após a concepção, no entanto, não é um trabalho fácil de executar a campo, pelo que um diagnóstico de gestação feito após o 32º dia obtém menos falsos negativos. O desenvolvimento embrionário ocorre muito rapidamente, pelo que esperar alguns dias poderá a levar-nos a melhores resultados, sendo que os resultados obtidos dependem também do executor da técnica. A palpação transretal deve ser feita sempre com cuidado de modo a que se assegure a saúde do feto. O diagnóstico de gestação por ecografia é muito mais eficiente até aos 120 dias de gestação do que um diagnóstico de gestação feito por palpação transretal (Colloton, 2014).

Na AASM-CUA não era utilizado o ecógrafo uma vez que os diagnósticos de gestação eram efetuados durante as ordenhas, era visto cada animal após terminar o seu processo de ordenha, de forma a não causar transtorno na rotina diária dos animais. Deste modo o diagnóstico era baseado com a informação da Tabela 17. Em muitos casos tinha de ser feita uma estimativa dos dias de gestação dos animais, uma vez que não existem dados sobre a concepção quando os animais andam constantemente com o touro.

Tabela 17: Diagnóstico de gestação em bovinos por palpação retal (Adaptado de Hafez & Hafez, 2000).

| Mês de gestação | Principais alterações |
|--------------------|--|
| 1º | Útero quiescente e desenvolvimento de corpo lúteo em um dos ovários. |
| 2º | Aumento e abaulamento dorsal do corno grávido devido à presença de fluidos fetais. Sensação resiliente se efetuada uma pressão digital; “deslizar das membranas” ou palpação do alantocórion; vesículas amnióticas anteriormente ao ligamento intercornual |
| 3º | Inicia-se a descida do útero; feto é palpável |
| 4º-7º | Útero no chão da cavidade abdominal, feto difícil de ser palpado; cotilédones são palpáveis de forma individual na parede uterina com cerca de 2-5 cm; hipertrofia das artérias uterinas médias e alteração do pulso para um frémito distinto |
| 7º-fim da gestação | Cotilédones, frémito e partes do feto são palpáveis. |

Nos casos em que existiam quistos ovários, ou animais em anestro, era feito tratamento hormonal adequado.

O diagnóstico de gestação em ovinos é uma prática de manejo importante, no entanto, deve ser feita a ponderação entre custos e ganhos, e a capacidade de manejo da exploração. O diagnóstico de gestação em ovinos é efetuado através de ecografia transabdominal, tratando-se de uma técnica fácil e rápida de executar.

Estimar a fertilidade dos touros possui especial importância, como foi referido. No entanto, um touro capaz de se reproduzir tem de ser um animal com líbido, saúde física no geral e sémen de boa qualidade. Num exame andrológico deve ser feito um exame físico completo em primeiro lugar, de modo a avaliar a saúde do animal e excluindo outras doenças, não relacionadas com o sémen do animal. De seguida, avalia-se a qualidade do sémen do animal através de diferentes parâmetros, tais como: palpação testicular e avaliação perímetro escrotal, palpação transretal com avaliação das glândulas anexas, densidade e volume de sémen, motilidade individual e de grupo (massal) dos espermatozoides, morfologia e vitalidade (Barth, 2007). Todos estes fatores devem ser avaliados num conjunto e não individualmente, tendo em conta fatores externos e forma de execução da técnica. Os exames andrológicos foram feitos com recurso à eletroejaculação.

2.2.6. Clínica de equídeos

Uma vez que o principal objetivo do estágio era o acompanhamento de clínica de espécies pecuárias, foram separadas todas as assistências no âmbito da medicina de equídeos na Tabela 18 sendo que não serão descritas em pormenor.

Tabela 18: Distribuição das intervenções e diagnósticos efetuados na clínica de equídeos, consoante local de estágio e espécie, em frequência absoluta (Fa) e relativa (Fr) (%) (n = 85).

| Área | | | Local de estágio | | | | | |
|-----------------------|--------------|---|------------------|--------|-------|--------|-------|--------|
| | | | AASM-CUA | | VetAI | | Total | |
| | | | Fa | Fr (%) | Fa | Fr (%) | Fa | Fr (%) |
| Clínica Médica | Diagnóstico | Abcesso de casco em equino | 0 | 0,00 | 1 | 1,19 | 1 | 1,18 |
| | | Reação anafilática em equino | 1 | 100,00 | 0 | 0,00 | 1 | 1,18 |
| | | Reação anafilática em asinino | 0 | 0,00 | 1 | 1,19 | 1 | 1,18 |
| | | Pneumonia em equino | 0 | 0,00 | 1 | 1,19 | 1 | 1,18 |
| | Procedimento | Dentisteria em equinos | 0 | 0,00 | 1 | 1,19 | 1 | 1,18 |
| | | Grelha veterinária numa prova de resistência equestre | 0 | 0,00 | 1 | 1,19 | 1 | 1,18 |
| Clínica Cirúrgica | Procedimento | Castração em equino | 0 | 0,00 | 1 | 1,19 | 1 | 1,18 |
| | | Exérese de nódulo cutâneo em equino | 0 | 0,00 | 1 | 1,19 | 1 | 1,18 |
| Exames de diagnóstico | Procedimento | Coprologia parasitária de equinos | 0 | 0,00 | 19 | 22,62 | 19 | 22,35 |
| | | Endoscopia em asinino | 0 | 0,00 | 1 | 1,19 | 1 | 1,18 |
| | | Endoscopia em equino | 0 | 0,00 | 1 | 1,19 | 1 | 1,18 |
| | | Raio-x em asinino | 0 | 0,00 | 1 | 1,19 | 1 | 1,18 |
| Controlo Reprodutivo | Procedimento | Diagnóstico de gestação por ecografia em equinos | 0 | 0,00 | 4 | 4,76 | 4 | 4,71 |
| | | Diagnóstico de gestação por ecografia em asininos | 0 | 0,00 | 1 | 1,19 | 1 | 1,18 |
| | | Recolha de sêmen em equino | 0 | 0,00 | 1 | 1,19 | 1 | 1,18 |

| | | | | | | | | |
|----------------------------------|--------------|--|-----|------|-----|-------|-----|-------|
| Profilaxia e Medicina Preventiva | Procedimento | Colheita de sangue em equino para hemótipo | 0 | 0,00 | 14 | 16,67 | 14 | 16,47 |
| | | Desparasitação em equino | 0 | 0,00 | 14 | 16,67 | 14 | 16,47 |
| | | Identificação de equinos | 0 | 0,00 | 11 | 13,1 | 11 | 12,94 |
| | | Vacinação em equino | 0 | 0,00 | 6 | 7,14 | 6 | 7,06 |
| | | Desparasitação em asinino | 0 | 0,00 | 2 | 2,38 | 2 | 2,35 |
| | | Marcação a frio de poldros com azoto líquido | 0 | 0,00 | 1 | 1,19 | 1 | 1,18 |
| | | Vacinação em asinino | 0 | 0,00 | 1 | 1,19 | 1 | 1,18 |
| | Total | 1 | 100 | 84 | 100 | 85 | 100 | |

2.2.7. Exame inicial em montarias

Tal como é referido no “Edital n.º1 – Tuberculose em caça maior”, do dia 29 de abril de 2011, “a presença comprovada do agente causal da tuberculose bovina, *Mycobacterium bovis*, em animais de caça maior, no território nacional, configura um fator de risco que coloca entraves à erradicação e controlo da tuberculose bovina e uma acrescida preocupação de saúde pública”. O Regulamento (CE) n.º853/2004, de 29 de abril, diz que com o objetivo de assegurar o controlo da caça selvagem colocada no mercado, o operador deve assegurar a realização do exame inicial, por um médico veterinário designado, bem como encaminhar os exemplares caçados para a inspeção oficial *post mortem* num estabelecimento aprovado.



Figura 34: Lesão compatível com tuberculose em linfonodo mesentérico

Durante a segunda parte do estágio curricular, realizada na VetAI, foi assistido ao exame inicial de caça maior de uma montaria, nomeadamente de sete javalis e 14 veados, dos quais três veados foram rejeitados por apresentarem lesões compatíveis com tuberculose, como está ilustrado na Figura 34.

3. Revisão bibliográfica: Agentes transmitidos por carrças causadores de doença em bovinos: *Anaplasma* spp., *Babesia* spp., *Ehrlichia* spp. e *Theileria* spp.

3.1. Introdução

As carrças são um dos principais vetores de agentes patogénicos transmitidos a humanos e animais, sendo apenas ultrapassadas pelos mosquitos. Em relação aos bovinos, são considerados o principal vetor, capaz de transmitir o mais amplo espectro de agentes patogénicos, incluindo vírus, bactérias, protozoários, fungos e nematodes (Hajdušek *et al.*, 2013; Bursakov & Kovalchuk, 2019; Guo *et al.*, 2019a).

As carrças e os agentes patogénicos por si transmitidos, nos quais se incluem *Babesia* spp., *Theileria* spp., *Anaplasma* spp. e *Ehrlichia* spp., afetam a produtividade dos bovinos em regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo, levando a um impacto socioeconómico significativo (Abdullah *et al.*, 2019; Gebrekidan *et al.*, 2019). Os agentes referidos anteriormente são considerados causadores de doenças infecciosas mas não contagiosas, sendo a sua distribuição geográfica e sazonal dependente dos seus vetores transmissores (Aubry & Geale, 2011; Constable *et al.*, 2017). Geralmente afetam os eritrócitos, levando a anemia, anorexia, icterícia, diminuição do ganho de peso, da produção e da reprodução, elevada morbilidade e mortalidade (Abdullah *et al.*, 2019).

Deste modo, são abordados assuntos como a taxonomia, epidemiologia, ciclo de vida, transmissão, patogenia, sinais clínicos, diagnósticos diferenciais, lesões *post mortem*, diagnóstico, tratamento e controlo dos agentes referidos anteriormente que afetam bovinos.

3.2. Agentes patogénicos

3.2.1. *Babesia* spp.

O género *Babesia* é um protozoário intraeritrocitário que inclui um vasto número de espécies, parasitas de uma larga variedade de hospedeiros, entre animais selvagens, domésticos e humanos, sendo conhecidas mais de 100 espécies (Sivakumar *et al.*, 2016; Karbowski *et al.*, 2018; Alvarez *et al.*, 2019; Gallego-Lopez *et al.*, 2019).

A babesiose, doença provocada pelo hemoparasita *Babesia* sp., é considerada uma das doenças de bovinos, causada por agentes patogénicos transmitidos por carrças, mais frequentes e importantes no mundo, sendo responsável por muitas perdas económicas, especialmente em animais imunodeprimidos em áreas endémicas (Almeria *et al.*, 2001; Alvarez *et al.*, 2019).

Hemoparasitas como *Babesia* spp. e *Theileria* spp. são vulgarmente chamados de piroplasmas, devido à forma em pera dos merozoítos que se encontram nos eritrócitos infetados (Homer *et al.*, 2000).

A localização sistemática e taxonomia referente ao género *Babesia* está descrita no Diagrama 1.

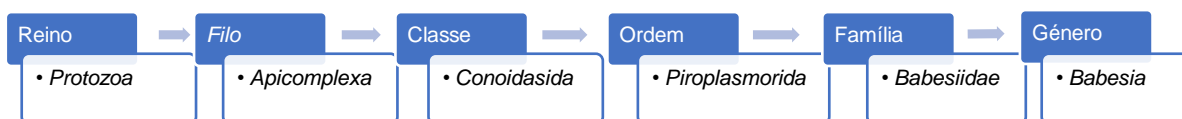


Diagrama 1: Taxonomia de *Babesia* spp. (Adaptado de Taylor et al., 2016).

Na Tabela 19 são registadas as espécies pertencentes ao género *Babesia* causadoras de doença em bovinos, bem como os seus principais vetores e distribuição.

Tabela 19: Espécies pertencentes ao género *Babesia* que infetam bovinos e respetivos vetores; as espécies a negrito estão reportadas em Portugal. (Adaptado de Silva et al., 2010; Gomes et al., 2013; Taylor et al., 2016; Constable et al., 2017; Staniec et al., 2018).

| Espécie | Vetores | Classificação | Distribuição Geográfica |
|---------------------------------|--|------------------------|--|
| <i>Babesia bigemina</i> | <i>Rhipicephalus annulatus</i> , <i>R. microplus</i> , <i>R. decoloratus</i> , <i>R. calcaratus</i> , <i>R. appendiculatus</i> , <i>R. bursa</i> , <i>R. evertsi</i> , <i>Ixodes ricinus</i> , <i>I. persulcatus</i> e <i>Haemaphysalis punctata</i> | Grande <i>Babesia</i> | Austrália, África, América, Ásia e Sul da Europa |
| <i>Babesia bovis</i> | <i>Rhipicephalus annulatus</i> , <i>R. microplus</i> , <i>Ixodes</i> , <i>persulcatus</i> e <i>I. Ricinus</i> | Pequena <i>Babesia</i> | Austrália, África, América, Ásia e Sul da Europa |
| <i>Babesia divergens</i> | <i>Ixodes ricinus</i> | Pequena <i>Babesia</i> | Norte da Europa |
| <i>Babesia major</i> | <i>Haemaphysalis puctata</i> | Grande <i>Babesia</i> | Europa, Norte de África, América do Sul |
| <i>Babesia occultans</i> | <i>Hyalomma marginatum</i> <i>rufipes</i> | Grande <i>Babesia</i> | Sul de África |
| <i>Babesia ovata</i> | <i>Haemaphysalis longicornis</i> | Grande <i>Babesia</i> | Japão e China |
| <i>Babesia jakimovi</i> | <i>Ixodes ricinus</i> | Grande <i>Babesia</i> | Norte da Europa (Sibéria) |

De um modo informal, de acordo com a dimensão dos merozoítos observados em esfregaços sanguíneos ao microscópio, são agrupadas em “pequenas babésias” (1 – 2,5 μm de tamanho) e, em “grandes babésias” (2,5 – 5 μm de tamanho) (Lempereur et al., 2017; Karbowiak et al., 2018).

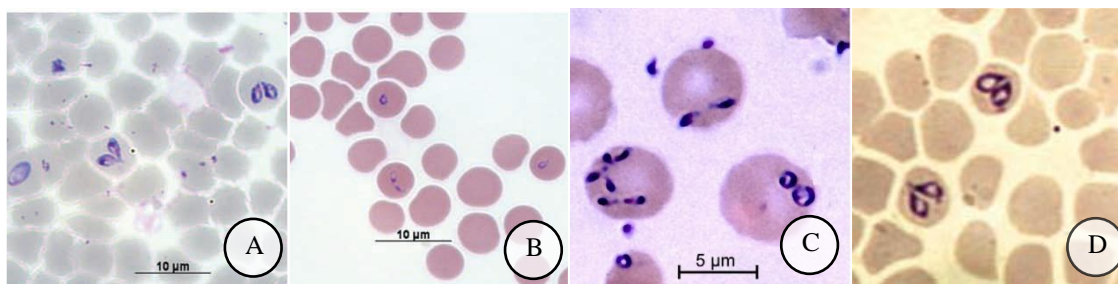


Figura 35: A – *Babesia bigemina* em eritrócitos de bovino, (Adaptado de Mosqueda et al., 2012); B - *Babesia bovis* eritrócitos de bovino, (Adaptado de Mosqueda et al., 2012); C - *Babesia divergens* em eritrócitos de humano, (Adaptado de Yabsley & Shock, 2013); D – *Babesia major* em eritrócitos de bovino corados pelo método de Giemsa, x 1000, (Adaptado de Taylor et al., 2016).

A maioria dos casos de patogenicidade em bovinos são causados pelas espécies *Babesia bovis*, *B. bigemina* e *B. divergens*, as espécies *B. major* e *B. occultans* são consideradas pouco patogênicas (Stilwell, 2013; Staniec et al., 2018), podendo ser observadas na Figura 35. A espécie *Babesia divergens* possui uma importância especial por ser agente de uma zoonose (Alvarez et al., 2019).

3.2.1.1. Ciclo de Vida e transmissão

Os esporozoítos móveis de *Babesia* spp. presentes na saliva da carrça, que estavam latentes nas glândulas salivares, aquando da sua refeição sanguínea são inoculados no hospedeiro vertebrado, infectando diretamente os eritrócitos; este processo é mediado por proteínas segregadas pelo complexo apical. Os esporozoítos desenvolvem-se em trofozoítos, ficando livremente dentro do citoplasma da célula e multiplicam-se de forma assexuada, através de divisão binária, para produzir merozoítos, no processo de merogonia ou esquizogonia (Lempereur et al., 2017; Jalovecka et al., 2018; Sivakumar et al., 2018; Gallego-Lopez et al., 2019; Jalovecka et al., 2019; Suarez et al., 2019). Existem trofozoítos e merozoítos em simultâneo na corrente sanguínea, a sua multiplicação leva à lise celular ocorrendo de seguida a infeção de novas células pelos merozoítos (Homer et al., 2000; Jalovecka et al., 2018). O processo de entrada dos merozoítos extracelulares dentro do eritrócito ocorre através de etapas, semelhantes em todos os Apicomplexa. Em primeiro lugar existe um reconhecimento por parte do parasita através da sua extremidade apical, o parasita liga-se, de forma reversível através de uma ligação estanque e dinâmica, ao eritrócito, de seguida existe uma reorientação, de forma a que os organelos apicais se desloquem para perto da interface de fixação, para que ocorra uma *tight junction*, irreversível, entre a superfície eritrocitária e o complexo apical; neste processo o contacto apical desencadeia a secreção de conteúdo essencialmente proteico proveniente dos micronemas e rhoptrias, resultando na invaginação da superfície dos eritrócitos. O parasita move-se para a depressão que criou e inicia-se a invasão do eritrócito, através de várias interações moleculares dos ligantes do protozoário com os recetores alvo da superfície da célula do hospedeiro, ocorrendo uma migração da extremidade anterior para a posterior do parasita, até se completar a sua internalização. O parasita fica assim encerrado num vacúolo parasitóforo

e, durante a fase final da invasão o conteúdo dos grânulos densos é libertado, causando uma expansão adicional da membrana que reveste o vacúolo. Por fim, ocorre a dissociação entre o vacúolo parasitóforo e o parasita de forma a que ocorra o contacto direto com o citoplasma do eritrócito (Preiser *et al.*, 2000; Yokoyama *et al.*, 2006; Sevilla *et al.*, 2018). Alguns merozoítos transformam-se em gamontes ou pré-gametócitos, que não se reproduzem de imediato mas aumentam de tamanho, para que posteriormente, no intestino da carraça, se desenvolvam em gâmetas, haplóides, conhecidos como corpos de *Ray* ou *Strahlenkörper*, antes de deixar os eritrócitos (Homer *et al.*, 2000; Schnittger *et al.*, 2012; Jalovecka *et al.*, 2019; Suarez *et al.*, 2019). A fertilização feita pelos gâmetas resulta na formação de um zigoto diplóide (Jalovecka *et al.*, 2018; Jalovecka *et al.*, 2019). De seguida, o zigoto entra no espaço ectoperitrófico e invade imediatamente as células epiteliais do intestino, ocorrendo uma divisão por meiose que resulta na formação de cinetos móveis (ocinetos), que farão o seu trajeto até à hemolinfa da carraça e irão invadir os tecidos internos (Jalovecka *et al.*, 2018; Gallego-Lopez *et al.*, 2019). Os oocinetos de *Babesia* spp. estão sujeitos a dois processos paralelamente, i) no primeiro invadem diversos tecidos internos da carraça e multiplicam-se, através de divisões múltiplas; ii) no segundo invadem as glândulas salivares e formam esporoblastos multinucleados que ficam latentes, garantindo a transmissão transtadial, até que o próximo estado larvar inicie a sua alimentação resultando na formação de esporozoítos e infete um hospedeiro (Jalovecka *et al.*, 2018; Gallego-Lopez *et al.*, 2019; Jalovecka *et al.*, 2019). As espécies pertencentes ao género *Babesia* no seu primeiro ciclo de multiplicação, invadem também células dos ovários, onde têm acesso aos ovos da carraça, o que permite ao parasita uma transmissão transovárica (Jalovecka *et al.*, 2018; Gallego-Lopez *et al.*, 2019).

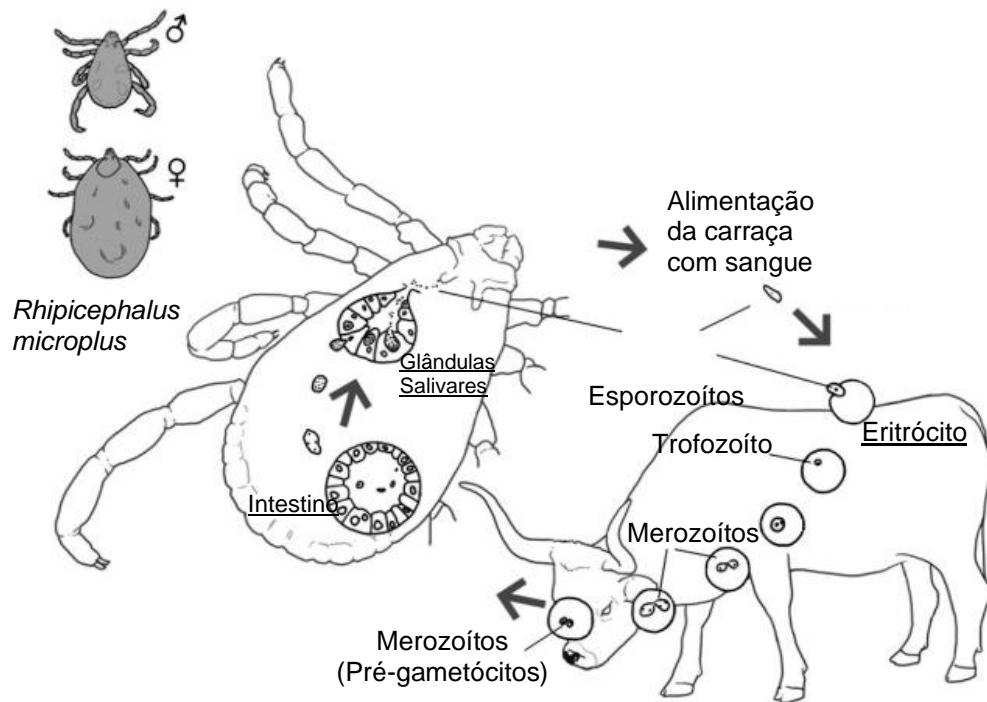


Figura 36: Ciclo de vida de *Babesia bovis* (Adaptado de Marcelino *et al.*, 2012).

A transmissão transovárica ocorre durante a alimentação de larvas e ninfas de carrapatos infetados por *Babesia bovis* e *B. bigemina*, respetivamente (Gallego-Lopez *et al.*, 2019; Spickler, 2018).

O ciclo de vida de *Babesia bovis* está ilustrado na Figura 36.

Após a infeção do bovino ocorre uma multiplicação de protozoários essencialmente em vasos viscerais no caso de *Babesia bovis* e em vasos periféricos no caso de *B. bigemina* (Constable *et al.*, 2017).

Durante a fase aguda da doença, os parasitas são detetados microscopicamente em circulação; podem ser encontrados em eritrócitos infetados, em menos de 0,5% no caso de *Babesia bovis*, 3% em infeções por *B. bigemina* e 35-40% por *B. divergens* (Bock *et al.*, 2004; Alvarez *et al.*, 2019).

São algumas as espécies de ixodídeos registados como principais transmissores de *Babesia* spp. (Tabela 19). A variação sazonal da doença ocorre após o pico de ação das carrapatos, que depende essencialmente da temperatura (Constable *et al.*, 2017).

As espécies pertencentes ao género *Babesia* podem ser transmitidas diretamente entre animais, através de trocas sanguíneas, por exemplo durante transfusões, e possivelmente quando pequenas quantidades de sangue são transferidas em agulhas reutilizadas, instrumentos cirúrgicos de campo, ou por picadas de moscas. A transmissão transplacentária foi demonstrada para *Babesia bovis* e *B. bigemina* em bovinos, mas considerada pouco frequente. Os animais podem apresentar sinais clínicos ou ser assintomáticos (Radostits *et al.*, 2006; Spickler, 2018).

3.2.1.2. Resposta imunitária e sinais clínicos

A resposta imunitária dos bovinos à infeção por *Babesia bovis* ou *B. bigemina* envolve mecanismos de resposta inata e adquirida. A resposta dirigida contra infeções por *Babesia* spp. é humoral e celular. O sistema imunitário dos bovinos gera uma resposta imune humoral massiva de modo a controlar infeções agudas, resultando no desenvolvimento de doença crónica persistente, onde a resposta imune adaptativa está presente. Uma imunidade relacionada com a idade para a infeção inicial por *Babesia bovis* em bovinos está bem estabelecida, caracterizada por forte imunidade inata em animais jovens, com duração de até seis meses. A imunidade dos animais jovens é adquirida passivamente através da ingestão do colostro, sendo que estes geralmente sofrem apenas infeções transitórias com sinais clínicos leves; no entanto, estas infeções são aparentemente suficientes para estimular a imunidade ativa, embora a recuperação seja seguida por um longo período durante o qual os animais são portadores. Bovinos com idade inferior a nove meses normalmente não apresentam sinais clínicos. Após a infeção parece existir uma imunidade durante aproximadamente seis meses, sendo que o hospedeiro é novamente suscetível um ano após a infeção. Estes períodos de resistência e proteção à reinfeção estão sujeitos a variações significativas e a diferentes respostas, consoante a espécie de hemoparasita e a raça de bovino (Taylor *et al.*, 2016; Constable *et al.*, 2017; Spickler, 2018; Gallego-Lopez *et al.*, 2019; Suarez *et al.*, 2019).

As espécies pertencentes ao gênero *Babesia* possuem graus variáveis de virulência, algumas são capazes de causar doenças graves, que podem ser fatais, enquanto outras induzem doenças leves a moderadas (Lempereur *et al.*, 2017; Gallego-Lopez *et al.*, 2019). A gravidade da babesiose está associada à multiplicação assexuada de parasitas nos eritrócitos do hospedeiro, levando a alta parasitemia seguida de eritrólise (Yokoyama *et al.*, 2006). Além da patogenicidade da espécie presente, a severidade da doença depende também da idade do animal, da competência do seu sistema imunitário e da presença de co-infecções com outros agentes patogênicos (Gallego-Lopez *et al.*, 2019).

Os sinais clínicos geralmente aparecem duas a três semanas após a inoculação de esporozoítos de *Babesia* spp. no sangue do hospedeiro, no entanto, o período de incubação pode ser tão curto quanto quatro a cinco dias para *Babesia bigemina* e 10-12 dias para *B. bovis* (Bock *et al.*, 2004).

Durante a fase clínica da doença, os sinais encontrados incluem: febre acima dos 41°C, mucosas pálidas (devido a anemia, podendo ocorrer uma destruição superior a 75% dos eritrócitos), icterícia, hemoglobinúria e hemoglobinemia (devido à hemólise), conseqüentemente, depressão, taquipneia (uma vez que ocorre uma diminuição da oxigenação dos tecidos) e taquicardia, anorexia, desidratação e morte (devido a anoxia anêmica) (Homer *et al.*, 2000; Taylor *et al.*, 2016; Constable *et al.*, 2017; Spickler, 2018; Alvarez *et al.*, 2019; Simas *et al.*, 2020). Podem ainda ocorrer sinais clínicos como: aborto e diminuição da fertilidade nos machos (Spickler, 2018). Sinais neurológicos, respiratórios e falhas em múltiplos órgãos são encontrados em infecções por *Babesia bovis*. A neurovirulência ocorre devido ao sequestro de eritrócitos nos capilares, através da citoadesão de eritrócitos infetados às células endoteliais, bem como vasodilatação e hipotensão resultante da estimulação da produção de substâncias vasoativas e um aumento da permeabilidade vascular (Sondgeroth *et al.*, 2014; Constable *et al.*, 2017; Sivakumar *et al.*, 2018; Alvarez *et al.*, 2019; Simas *et al.*, 2020). Estão reportados como frequentes casos em que ocorre diarreia numa fase precoce de infecção causada por *Babesia divergens*, devido à alteração na motilidade intestinal e ruminal, com um fluxo estreito de diarreia devido aos espasmos do esfíncter anal (Zintl *et al.*, 2003; Eddy *et al.*, 2004; Spickler, 2018). Nos animais que sobrevivem a infecções agudas existem alterações isquêmicas nos músculos esqueléticos e cardíacos (Constable *et al.*, 2017).

Em casos de infecção por *Babesia bigemina* a mortalidade pode ser superior a 50%, no entanto, na ausência de *stress* a maioria dos animais sobrevive (Taylor *et al.*, 2016). Os animais podem tornar-se portadores de infecções crônicas assintomáticas, permanecendo como reservatórios para uma posterior transmissão; a exacerbação de parasitemia pode ocorrer em intervalos irregulares (Almeria *et al.*, 2001; Lempereur *et al.*, 2017; Alvarez *et al.*, 2019).

Em casos de infecção por *Babesia bovis* a infecção pode permanecer para o resto da vida do animal, enquanto em infecções por *B. bigemina* os animais tornam-se portadores durante 22 meses (Goff *et al.*, 2008). A sobrevivência e a possibilidade de multiplicação do parasita em animais imunes ocorre devido a alguns fatores como: variação antigênica rápida, cito-adesão e

sequestro, ligação de proteínas do hospedeiro à superfície de eritrócitos infetados, expressão monoalélica de diferentes membros de famílias multigénicas e estabelecimento de imunossupressão transitória (Constable *et al.*, 2017; Suarez *et al.*, 2019).

O prognóstico depende da rapidez de atuação no tratamento da doença (Sivakumar *et al.*, 2018).

3.2.2. *Theileria* spp.

Os parasitas intracelulares do género *Theileria* pertencem à ordem *Piroplasmida*, tal como *Babesia* spp., como consta no Diagrama 2. O género *Theileria* diferencia-se pela capacidade de infeção de leucócitos por esporozoítos e subsequente infeção de eritrócitos (Mans *et al.*, 2015). Tal como a babesiose, a theileriose, doença causada por hemoparasitas do género *Theileria*, leva a elevadas perdas económicas e pode afetar diversas espécies animais (Mans *et al.*, 2015).

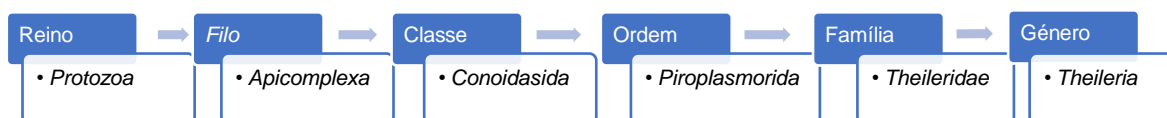


Diagrama 2: Taxonomia de *Theileria* spp. (Adaptado de Taylor *et al.*, 2016).

Na Tabela 20 estão registadas as espécies pertencentes ao género *Theileria* que infetam os bovinos, os seus principais vetores e distribuição geográfica.

Tabela 20: Espécies pertencentes ao género *Theileria* que infetam bovinos e respetivos vetores; as espécies a negrito estão reportadas em Portugal. (Adaptado de Branco *et al.*, 2010; Gomes *et al.*, 2013; Stilwell, 2013; Mans *et al.*, 2015; Taylor *et al.*, 2016; Constable *et al.*, 2017; Spickler, 2019).

| Espécie | Doença associada | Vetores | Distribuição Geográfica |
|---|---|---|--|
| <i>Theileria annulata</i> | Theileriose tropical ou Theileriose mediterrânica | <i>Hyalomma detritum</i> , <i>H. anatolicum excavatum</i> , <i>H. truncatum</i> , <i>H. dromedarii</i> , <i>H. turanicum</i> e <i>H. marginatum</i> | Países Mediterrâneos, Médio Oriente, África, Índia e China |
| <i>Theileria parva</i> (subspecies <i>Theileria parva lawrencei</i> , <i>Theileria parva parva</i> , <i>Theileria parva bovis</i>) | Febre da Costa Este | <i>Rhipicephalus appendiculatus</i> e <i>R. zambeziensis</i> | África Central e de Este |
| Complexo <i>Theileria orientalis</i> <i>Theileria buffeli</i> <i>Theileria sergenti</i> | Theileriose oriental | <i>Amblyoma variegatum</i> , <i>A. cohaerens</i> , <i>A. Hebraeum</i> . <i>Haemaphysalis bispinosa</i> , e <i>H. sergenti</i> | Sul da Europa, Médio Oriente, Ásia e Austrália |
| <i>Theileria taurotragi</i> | | <i>Rhipicephalus appendiculatus</i> e <i>R. pulchellus</i> | África |

| | | | |
|---------------------------|--|--|---|
| <i>Theileria velifera</i> | | <i>Amblyoma variegatum</i> , <i>A. lepidum</i> e <i>A. hebraeum</i> | África |
| <i>Theileria mutans</i> | | <i>Amblyoma variegatum</i> e <i>Haemaphysalis</i> spp. | África, Ásia, Europa, América do Norte |

Segundo Spickler (2019) é possível que os três organismos referidos na Tabela 20 no complexo *Theileria orientalis* sejam a mesma espécie, denominada de *Theileria orientalis* ou *T. buffeli*. O complexo *Theileria orientalis* possui 11 genótipos, tipos 1-8 e N1, N2 e N3; os tipos 1-3, são frequentemente reconhecidos como *Chitose*, *Ikeda* e *Buffeli*, respetivamente (Spickler, 2019).

A espécie *Theileria parva* é considerada a mais virulenta, existindo apenas no continente africano (Stilwell, 2013; Guo *et al.*, 2018). Alguns genótipos de *Theileria orientalis* estão associados a doença subclínica; *T. velifera* está associada a uma theileriose leve; *T. mutans* está associada a theileriose benigna (Constable *et al.*, 2017).

Algumas das espécies pertencentes ao género *Theileria* que afetam bovinos podem ser observadas na Figura 37.

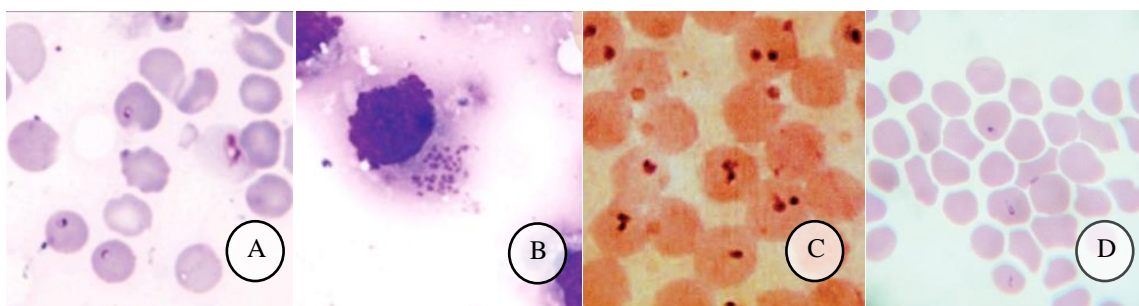


Figura 37: A - Esfregaço de sangue com formas anelares de piroplasmas de *Theileria annulata* nos eritrócitos de bovino, corado pelo método de Giemsa, x 1000, (Adaptado de Branco *et al.*, 2010); B - Esfregaço de linfonodo mostrando um esquizonte (corpo azul de Koch) de *Theileria annulata* numa célula mononuclear de bovino, corado pelo método de Giemsa, x 1000, (Adaptado de Branco *et al.*, 2010); C - Forma intraeritrocitária de *Theileria parva* em bovino, corado pelo método de Giemsa, x 1000, (Adaptado de Taylor *et al.*, 2016); D - Esfregaço de sangue com forma intraeritrocitária de *Theileria orientalis*, em bovino, corado pelo método de Giemsa, x1000, (Adaptado de Kakati *et al.*, 2015).

3.2.2.1. Ciclo de vida e transmissão

Os ixodídeos, ninfas e adultos, durante a refeição sanguínea libertam esporozoítos, que infetam os leucócitos, monócitos e linfócitos; estes esporozoítos são imóveis, sendo um acontecimento fortuito a interação inicial entre estes e as células do hospedeiro. Após a infeção, ficam livres no citosol, onde, num processo de esquizogonia, se multiplicam, de forma assexuada, formando esquizontes ou Corpos Azuis de Koch e resultando em merozoítos. Os esporozoítos, podem também infetar macrófagos e células dendríticas; contudo, nestas células, os esquizontes apenas se desenvolvem nos estádios primordiais (Shaw, 2003; Mans *et al.*, 2015; Nene & Morrison, 2016; Lempereur *et al.*, 2017; Jalovecka *et al.*, 2018). A espécie *Theileria parva* infeta predominantemente linfócitos T e B, enquanto *T. annulata* tem como alvo linfócitos B e macrófagos (Schubert *et al.*, 2010). O desenvolvimento do estágio de esquizonte, nos leucócitos,

induz a ativação e proliferação dos leucócitos hospedeiros infetados e, associando-se ao fuso mitótico durante a divisão celular, os parasitas conseguem dividir-se ao mesmo tempo que as células hospedeiras, garantido a infecção das várias células, aumentando assim exponencialmente o número de formas parasitárias (Nene & Morrison, 2016). Assim, a esquizogonia permite uma rápida multiplicação de parasitas, originando esquizontes (ou Corpos Azuis de Koch), capazes de modular a resposta imunitária do hospedeiro, alterando a sua capacidade de proliferação de forma indefinida. Como referido anteriormente, as espécies *Theileria parva*, *T. annulata* e *T. taurotragi* promovem uma transformação neoplásica nas células do hospedeiro, tornam-se resistentes à apoptose e adquirem a capacidade de invadir e de se multiplicarem nos tecidos não linfoides e linfoides do hospedeiro (Schubert *et al.*, 2010; Jalovecka *et al.*, 2018). Este processo facilita a rápida multiplicação de parasitas antes da diferenciação para o estágio de merozoíto infeccioso (Nene & Morrison, 2016). Os merozoítos são libertados, através da ruptura dos leucócitos, e invadem os eritrócitos; deste modo, quando as carraças, larvas e ninfas, se alimentarem nos animais infetados vão ingerir eritrócitos infetados com merozoítos de *Theileria* spp. (Branco *et al.*, 2010; Mans *et al.*, 2015; Nene *et al.*, 2016). Como representante dos Apicomplexa, ocorrem no género *Theileria* os processos de merogonia, gametogonia e esporogonia (Figura 38) (Jalovecka *et al.*, 2019). Neste género os gamontes são formados no intestino da carraça, diferenciam-se em microgâmetas e macrogâmetas, ocorrendo de seguida a fecundação e a formação do zigoto, contrariamente a *Babesia* spp., os oocinetos não são sujeitos a dois ciclos de multiplicação assexuado migrando diretamente para as glândulas salivares, sem que ocorra a invasão de outros tecidos, ocorrendo apenas transmissão transtadial (Nene *et al.*, 2016; Jalovecka *et al.*, 2018).

O desenvolvimento sexual deste protozoário parece ser um processo longo, uma vez que: o aparecimento dos primeiros gâmetas ocorre entre um a cinco dias após a repleção da carraça e a libertação dos oocinetos na hemolinfa 13 a 34 dias depois; contudo, no caso de *Theileria parva* as carraças infetadas começam a transmissão do parasita a partir das 72 horas desde a sua fixação com o hospedeiro, permanecendo infecciosas durante 11 meses (Constable *et al.*, 2017; Jalovecka *et al.*, 2018).

A transmissão de *Theileria* spp. ocorre por intermédio de carraças que atuam como vetores biológicos, as principais espécies estão registadas na Tabela 20. Deste modo, a epidemiologia da doença é dependente da sua distribuição e habitat e da sua capacidade de completar o seu desenvolvimento até à fase adulta. As carraças adultas são vetores mais eficientes do que as ninfas, sendo que em cada estágio de desenvolvimento ocorre uma amplificação da competência do vetor na transmissão parasitária e na capacidade de infetar mais do que um hospedeiro durante o seu ciclo de vida. Normalmente, a maturação de *Theileria* spp. só ocorre após a alimentação da carraça no hospedeiro, no entanto, em casos de elevada temperatura, pode ocorrer a maturação de *Theileria parva* em carraças no solo (Constable *et al.*, 2017; Spickler, 2019).

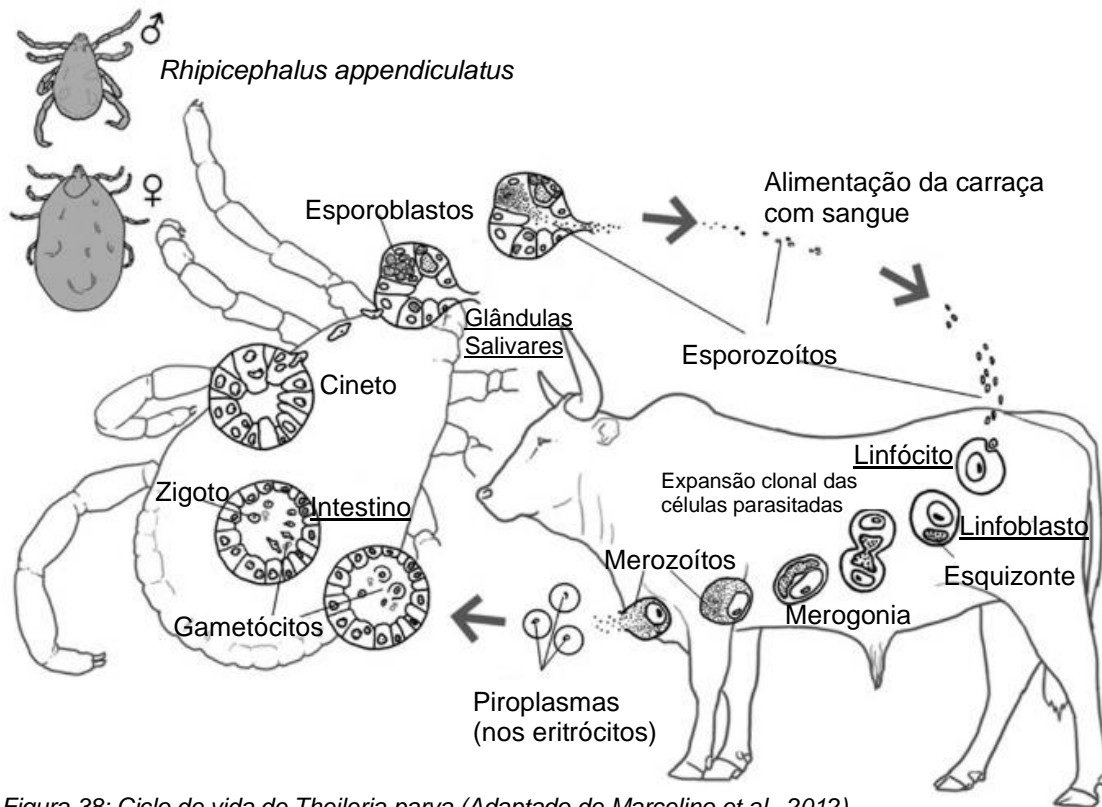


Figura 38: Ciclo de vida de *Theileria parva* (Adaptado de Marcelino et al., 2012).

Pode ocorrer também a transmissão mecânica através de fomites, moscas ou piolhos. A transmissão vertical entre bovinos foi reportada para *Theileria annulata* e *T. orientalis* (Spickler, 2019).

Em infecções por *Theileria annulata* cerca de 90% dos eritrócitos podem estar parasitados, com um ou mais merozoítos; e em infecções por *T. parva* até 30%, não estando a virulência correlacionada com a percentagem de eritrócitos infetados (Constable et al., 2017).

3.2.2.2. Resposta Imunitária e sinais clínicos

A resposta imunitária contra *Theileria* spp. é mediada essencialmente por mecanismos celulares, requerendo o desenvolvimento de uma resposta de células T CD8+ contra antígenos de superfície de linfócitos infetados com esquizontes. (Ahmed et al., 2008; Nene & Morrison, 2016).

A infecção por *Theileria* spp. pode causar doença aguda, subaguda ou crónica. Nas áreas endémicas, as raças autóctones afetadas apresentam essencialmente doença subaguda e são resistentes à reinfeção após a recuperação (Branco et al., 2010).

O período de incubação de *Theileria parva* varia entre uma a três semanas, variando consoante a estirpe e a dose infetante (Constable et al., 2017).

Os sinais clínicos mais comuns de doença são: fraqueza, perda de peso, diminuição da produção de leite, anorexia, aumento da temperatura corporal, taquicardia, petéquias e equimoses nas mucosas conjuntival e oral, corrimento ocular e nasal, linfadenomegália, mucosas pálidas (devido a anemia), icterícia, hemoglobinúria, leucopenia, tosse, dispneia e diarreia

(Hasanpour *et al.*, 2008; Constable *et al.*, 2017; Mohammed & Elshahawy, 2018; Spickler, 2019). Os esquizontes são o estágio com maior responsabilidade pelas alterações fenotípicas das células alvo; os macrófagos infetados por esquizontes apresentam um aumento da síntese e da atividade de metaloproteínas, que atuam como fatores de virulência, resultando em algumas das lesões observadas nas doenças, nomeadamente a capacidade metastática das células infetadas e a presença de úlceras em alguns órgãos (por exemplo, abomaso) e caquexia, por digestão da matriz extracelular (Branco, 2010). A linfadenomegália é consequente da proliferação de células infetadas e de células linfóides resultantes da resposta imunitária, sendo que os primeiros linfonodos a serem afetados são os linfonodos pré-escapulares, devido aos locais de eleição na presença de carraças (Branco, 2010; Mohammed & Elshahawy, 2018). A imunossupressão pode ocorrer nos estádios agudos da doença, sendo geralmente mais acentuada em infeções por *Theileria parva* (Constable *et al.*, 2017). Em casos de doença aguda ocorre desorganização e destruição do sistema linfóide podendo culminar em morte, devido a edema pulmonar massivo associado à migração de células infetadas para os pulmões, que libertam substâncias vasoativas (Durrani *et al.*, 2012; Constable *et al.*, 2017). O nível de hemólise depende da carga parasitária, ocorrendo esta devido à peroxidação lipídica da membrana dos eritrócitos induzida pelos merozoítos (Constable *et al.*, 2017).

Nos estádios mais avançados da doença os animais infetados não se conseguem levantar, ocorrendo o aparecimento de diarreia e de hipotermia. Sinais como icterícia, desidratação e melena são ocasionais (Hasanpour *et al.*, 2008; Mohammed & Elshahawy, 2018).

Nos casos de infeção por *Theileria annulata* ocorre também opacidade da córnea levando à cegueira, lacrimejar severo, conjuntivite bilateral e fotofobia, exoftalmia e lesões da pele, edema subcutâneo, nódulos, lesões hemorrágicas, ulcerativas e papuloeritematosas (Constable *et al.*, 2017; Mohammed & Elshahawy, 2018; Spickler, 2019).

A espécie *Theileria parva* pode provocar uma condição fatal que leva ao aparecimento de sinais neurológicos, denominada de theileriose cerebral bovina, devido à presença de células infetadas nos capilares do sistema nervoso central, que levam ao surgimento de vasculite e inflamação linfocítica do cérebro, caracterizado por movimentos descontrolados, cegueira unilateral, movimentos de andar em círculo, “*head pressing*”, ataxia, opistótonos e paralisia. As espécies *Theileria annulata* e *T. taurotragi* podem também levar ao aparecimento desta condição, apesar de ocorrer com menor frequência. (Kaleibar *et al.*, 2014; Catalano *et al.*, 2015; Spickler, 2019).

Sinais como queratite e bleforoespasma estão também referidos em infeções por *Theileria parva* (Constable *et al.*, 2017).

Em relação a theileriose oriental, infeções com o genótipo *Ikeda* têm sido reportadas em surtos, cujos sinais clínicos são: pirexia, letargia, inaptência, linfadenopatia, mucosas pálidas (devido a anemia hemolítica), mucosas pálidas, icterícia, hemoglobínúria, taquicardia, taquipneia, anorexia, diarreia, corrimento nasal, diminuição da produção de leite e perdas reprodutivas, como

aborto e nados mortos, e morte em casos severos (Gebrekidan *et al.*, 2019; Lawrence *et al.* 2019; Spickler, 2019).

As restantes espécies pertencentes ao género *Theileria* tendem a tornar os animais portadores assintomáticos, no entanto podem demonstrar alguns sinais clínicos, em especial quando existam co-infecções (Spickler, 2019).

3.2.3. *Anaplasma spp.*

Anaplasma spp. é uma bactéria intracelular obrigatória gram-negativa (Rymaszewska & Grenda, 2008; Aubry & Geale, 2011).

No Diagrama 3 é apresentada a localização sistemática e respetiva taxonomia de *Anaplasma spp.*, pertencente à família *Anaplasmataceae*.



Diagrama 3: Taxonomia de *Anaplasma spp.* (Adaptado de Taylor *et al.*, 2016).

A anaplasmosose é a doença provocada por um agente (*Anaplasma spp.*) transmitido por carrças com maior prevalência no mundo, sendo considerada uma doença endémica a Sul de Portugal (Stilwell, 2013; Moore & Strickland, 2018). O género *Anaplasma* afeta diversas espécies domésticas e selvagens (Spickler, 2013). As espécies que afetam bovinos, bem como a sua distribuição geográfica e os principais vetores encontram-se na Tabela 21.

As taxas de seroprevalência de *Anaplasma spp.* variam amplamente entre países e a variabilidade dessas taxas contribui para o desenvolvimento de regiões enzoóticas geograficamente estáveis. A epidemiologia desta doença depende de fatores como: transmissão, idade do hospedeiro, raça, intensidade da infestação por vetores e densidade de animais; o manejo adequado da doença depende do conhecimento da sua prevalência e dos fatores de risco associados à sua transmissão (Silva *et al.*, 2014).

Na Figura 39 observam-se algumas das espécies pertencentes ao género *Anaplasma* que afetam bovinos.

Tabela 21: Espécies pertencentes ao género *Anaplasma* que infetam bovinos e respetivos vetores. (Adaptado de Rymaszewska & Grenda, 2008; Taylor *et al.*, 2016; Dugat *et al.*, 2017).

| Espécie | Célula que infeta | Vetores | Distribuição Geográfica |
|----------------------------|-------------------|--|---|
| <i>Anaplasma marginale</i> | Eritrócito | <i>Rhipicephalus annulatus</i> , <i>R. decoloratus</i> , <i>R. microplus</i> , <i>Dermacentor andersoni</i> , <i>D. occidentalis</i> e <i>D. variabilis</i> . | África, Sul da Europa, Austrália, América do Sul, Ásia, antigos Estados Soviéticos, Estados Unidos da América |

| | | | | |
|----------------------------------|-------------|--|---|--|
| <i>Anaplasma centrale</i> | Eritrócito | <i>Ixodes</i> spp. <i>Haemaphysalis</i> sp | e | Por todo o mundo em zonas de clima tropical e subtropical, incluindo o Sul da Europa, e algumas áreas temperadas dos Estados Unidos da América |
| <i>Anaplasma phagocytophilum</i> | Granulócito | <i>Ixodes ricinus</i> , <i>I. scapularis</i> , <i>I. pacificus</i> , <i>I. persulcatus</i> , <i>I. spinipalpis</i> , <i>Rhipicephalus</i> <i>pusillus</i> , <i>Dermacentor</i> <i>marginatus</i> , <i>Hyalomma</i> <i>marginatum</i> e <i>Haemaphysalis punctata</i> . | e | Provavelmente mundial, Europa (Reino Unido, Noruega, Finlândia, Holanda e Áustria) |
| <i>Anaplasma bovis</i> | Monócito | <i>Hyalomma anatolicum</i> , <i>Rhipicephalus appendiculatus</i> , <i>Amblyomma cajennense</i> e <i>A. variegatum</i> | | África, Médio Oriente (Turquia e Irão), Índia e Sri Lanka |

A espécie *Anaplasma centrale* não é considerada patogénica, podendo causar apenas doença subclínica (Stilwell, 2013). A espécie *Anaplasma phagocytophilum* possui especial importância por se tratar de um agente zoonótico (Rymaszewska & Grenda, 2008). A espécie *Anaplasma bovis* era inicialmente conhecido por *Ehrlichia bovis* (Dumler *et al.*, 2001).

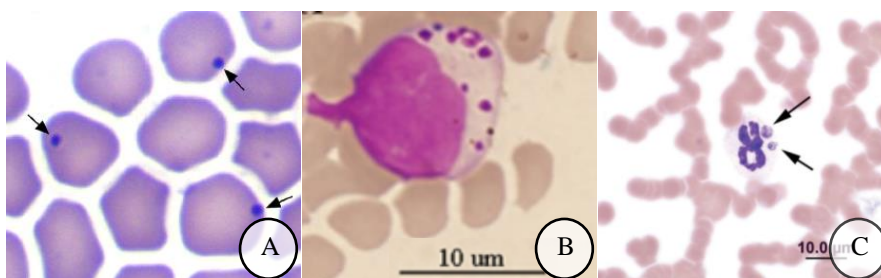


Figura 39: A - *Anaplasma marginale* (setas) em eritrócitos de bovinos (Adaptado de Nicholson *et al.*, 2019); B – Inclusões de *Anaplasma bovis* em monócitos de ovino (Adaptado de Liu *et al.*, 2012); C – Mórdulas de *Anaplasma phagocytophilum* em neutrófilo de equino, coloração de Wright-Giemsa, x 100 (Adaptado de Uehlinger *et al.*, 2011).

3.2.3.1. Ciclo de vida e transmissão

Os ixodídeos são considerados os principais vetores de *Anaplasma* spp., infetando-se no hospedeiro durante a sua alimentação, servindo também de reservatório, nas glândulas salivares (Zabel & Augusto, 2018). As carraças infetam-se durante a sua ingurgitação com eritrócitos (ou leucócitos, no caso de *Anaplasma phagocytophilum* e *A. bovis*) infetados (Hajdušek *et al.*, 2013). A bactéria em primeiro lugar invade e coloniza o epitélio do intestino médio, num processo mediado por recetores, envolvendo a proteína superficial MSP1a, proteína também envolvida na adesão aos eritrócitos dos bovinos, no caso de *Anaplasma marginale* (Kocan *et al.*, 2010; Hammac *et al.*, 2014). Após a sua internalização, este é encerrado dentro de um vacúolo

parasitóforo, onde transita para a forma reticulada (forma vegetativa), que se multiplica por divisão binária, formando grandes colônias; de seguida, a forma reticulada origina a forma de núcleo denso capaz de sobreviver fora das células do hospedeiro (forma infeciosa). Estas formas são então libertadas para infetar células adjacentes (Kocan *et al.*, 2003; Marcelino *et al.*, 2012; Crosby *et al.*, 2015). Após replicação inicial no epitélio intestinal (forma vegetativa), *Anaplasma marginale*, entra na hemolinfa e subsequentemente invade as células epiteliais da glândula salivar (forma infeciosa), onde sofre uma replicação final e desenvolve infeciosidade para os ruminantes; deste modo, a transmissão de *Anaplasma marginale* requer que ocorra uma invasão e multiplicação nos tecidos do ixodídeo, e termina o seu desenvolvimento na glândula salivar da carraça (Hammac *et al.*, 2014). Durante a sua alimentação ocorre a infeção do hospedeiro, sendo que na entrada de agentes patogénicos da família *Anaplasmataceae* nas células dos hospedeiros participa uma ampla gama de proteínas (Moumène & Meyer, 2016).

A infeção dos bovinos ocorre pelos estádios de ninfa e adultos de carraça (Zabel & Augusto, 2018). Não existe transmissão transovárica na maioria das espécies, apenas transmissão transtadial, no entanto *Anaplasma marginale* é capaz de efetuar uma transmissão vertical na carraça, mantendo-se esta como reservatório; existe também dentro da espécie uma transmissão intrastadial efetuada por machos de *Dermacentor* spp., uma vez que estes ficam persistentemente infetados (Kocan *et al.*, 2003; Rikihisa, 2011; Hove *et al.*, 2018; Zabel & Augusto, 2018).

Na Figura 40 está representado o ciclo de vida de *Anaplasma marginale*. Esta espécie é capaz de efetuar uma infeção persistente ao seu hospedeiro ruminante, alcançada através da evasão ao sistema imunológico, usando um mecanismo de variação antigénica no qual são expressas diferentes variantes das proteínas de membrana externa (Crosby *et al.*, 2015).

Após a deteção da infeção eritrocitária, o número de eritrócitos infetados aumenta geometricamente, duplicando a cada 24 horas; durante a fase aguda o número de células infetadas pode ser superior a 10^9 por mililitro de sangue; de seguida, o número de eritrócitos infetados diminui à medida que estes são fagocitados pelas células reticuloendoteliais bovinas (Aubry & Geale, 2011; Kocan *et al.*, 2003).

As principais espécies de carraças transmissoras de *Anaplasma* spp. estão enumeradas na Tabela 21.

O género *Anaplasma* pode ser transmitido de forma biológica ou mecânica, através de fomites, tais como agulhas, serras de descorna, arganéis, instrumentos de tatuagem, alicates de colocar brincos e instrumentos de castração. Pode ainda ser feita de forma mecânica através de outros artrópodes, como *Tabanus* spp. e *Stomoxys* spp., ou piolhos picadores-sugadores como, *Haematopinus* spp. e *Linognathus* spp. (Kocan *et al.*, 2003; Kocan *et al.*, 2010; Marcelino *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2014; Constable *et al.*, 2017; Zabel & Augusto, 2018).

A transmissão por via transplacentária está descrita para infeções por *Anaplasma* spp., através da passagem de eritrócitos infetados pela placenta, sem que ocorra amplificação do agente (Kocan *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2014; Constable *et al.*, 2017).

A sazonalidade pode estar presente na transmissão de *Anaplasma* spp. de acordo com os vetores envolvidos; surtos de inverno estão associados a transmissão iatrogénica ou a carraças de inverno (Constable *et al.*, 2017).

Rhipicephalus sp. *Dermacentor* sp.

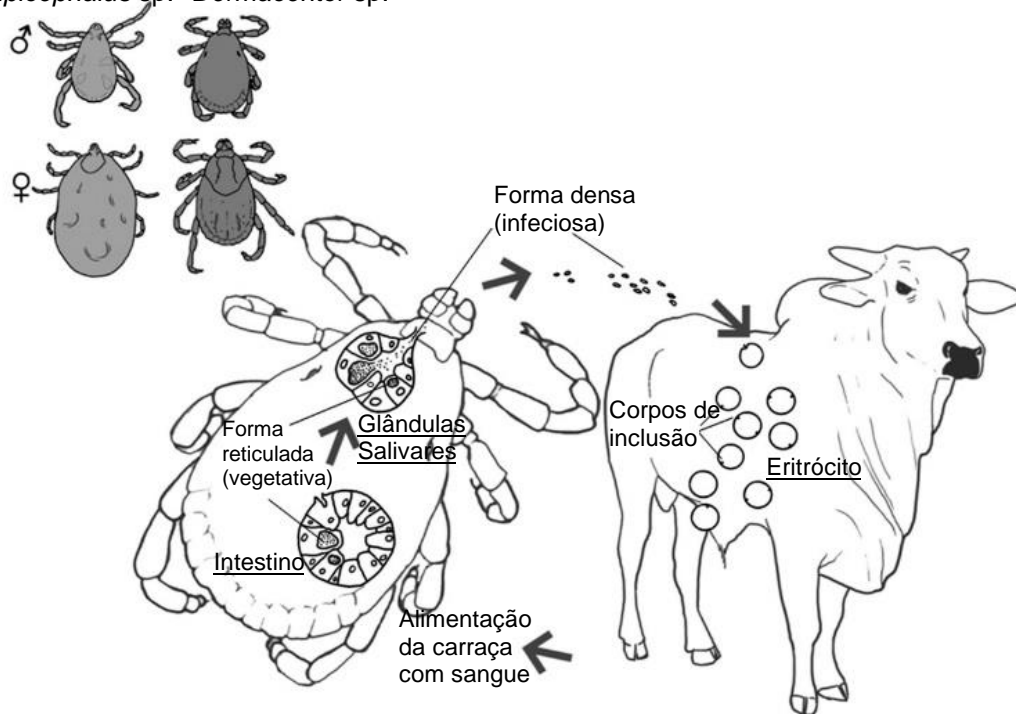


Figura 40: Ciclo de vida de *Anaplasma marginale* (Adaptado de Marcelino *et al.*, 2012).

3.2.3.2. Resposta Imunitária e sinais Clínicos

É sugerido que a imunidade protetora à infeção por *Anaplasma* spp. exija a ativação das respostas das células T CD4+ e de anticorpos (Brown, 2012).

Ao longo da vida dos animais portadores existem ciclos de 10 a 14 dias, em que há um aumento e uma diminuição do número de eritrócitos infetados, devido à presença de picos subsequentes de bacteriemia, controlados por anticorpos IgG2 (Aubry & Geale, 2011; Brown, 2012)

O período de incubação do agente depende da dose infecciosa, variando entre sete e 60 dias, com uma média de 28 dias (Zabel & Augusto, 2018).

Os sinais clínicos de anaplasmosose são variados, podendo levar a infeções agudas ou subclínicas, variando consoante a virulência do agente patogénico, resistência da raça e idade do hospedeiro. Incluem anemia e icterícia sem hemoglobinemia e hemoglobinúria, resultante numa fagocitose em massa dos eritrócitos infetados, pelo sistema reticuloendotelial, febre (39,5 – 41 °C), letargia, anorexia, perda de peso, dispneia, aborto, depressão da função testicular e pode levar à morte de animais (Aubry & Geale, 2011; Smith, 2015; Constable *et al.*, 2017; Hove *et al.*, 2018).

Os sinais clínicos de *Anaplasma marginale* ocorrem, normalmente, em animais com idade superior a dois anos; animais com menos de nove meses são assintomáticos (Kocan *et al.*, 2003; Hove *et al.*, 2018). No caso de *Anaplasma phagocytophilum*, anaplasmosse granulocítica, os sinais incluem leucopenia e trombocitopenia, podendo ocorrer o aparecimento de infecções secundárias (Rikihisa, 2011).

Os animais que sobrevivam a infecções causadas por *Anaplasma* spp. tornam-se portadores para o resto da vida, sofrendo ciclos sucessivos de riquetsemia (Hove *et al.*, 2018).

Segundo Aubry & Geale (2011), consoante a suscetibilidade do hospedeiro, podem ser infetados entre 10% a 90% dos eritrócitos, surgindo os sinais clínicos quando estão infetados mais de 15% dos eritrócitos.

3.2.4. *Ehrlichia* spp.

As espécies representantes do género *Ehrlichia* são bactérias intracelulares obrigatórias gram-negativas, agentes de ehrlichiose, considerada como um dos grandes obstáculos à elevada produção dos animais, em especial de raças exóticas em áreas endémicas (Spickler, 2015; Ringo *et al.*, 2018).

No Diagrama 4 está representada a localização sistemática e respetiva taxonomia do género *Ehrlichia* que, tal como *Anaplasma* spp., pertence à família *Anaplasmataceae*.



Diagrama 4: Taxonomia de *Ehrlichia* spp. (Adaptado de Taylor *et al.*, 2016).

A erliquiose é uma doença emergente em humanos e animais domésticos. As espécies que afetam bovinos, assim como os seus principais vetores e distribuição geográfica, estão representados na Tabela 22.

Tabela 22: Espécies pertencentes ao género *Ehrlichia* que infetam bovinos e respetivos vetores. (Adaptado de Taylor *et al.*, 2016; Cabezas-Cruz *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2019).

| Espécie | Vetores | Distribuição Geográfica |
|------------------------------|--|--|
| <i>Ehrlichia ruminantium</i> | <i>Amblyomma hebraeum</i> , <i>A. variegatum</i> , <i>A. pomposum</i> , <i>A. gemma</i> , <i>A. lepidum</i> , <i>A. tholloni</i> , <i>A. sparsum</i> , <i>A. astrion</i> , <i>A. cohaerens</i> , <i>A. marmoreum</i> , <i>A. maculatum</i> , <i>A. cajennense</i> , e <i>A. dissimile</i> | África, Sul do Sahara e Caraíbas (Guadalupe e Antígua) |
| <i>Ehrlichia minasensis</i> | <i>Rhipicephalus microplus</i> , <i>R. appendiculatus</i> , <i>Hyalomma</i> <i>marginatum</i> e <i>H. anatolicum</i> | Canadá, Brasil, França, Paquistão, Etiópia, África do Sul e Israel |

As estirpes de *Ehrlichia ruminantium*, antes denominadas por *Cowdria ruminantium*, possuem elevada diversidade, com variações na sua virulência, sendo responsável por causar pericardite exsudativa em bovinos (Dumler *et al.*, 2001; Spickler, 2015; Guo *et al.*, 2018). Na Figura 41 encontram-se diferentes apresentações de *Ehrlichia ruminantium*.

A espécie *Ehrlichia minasensis* é considerada um agente patogénico emergente, tendo sido negligenciado devido à sua reduzida importância económica (Li *et al.*, 2019).

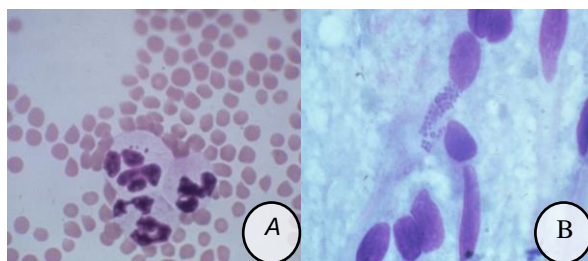


Figura 41: A - Neutrófilo de caprino com *Ehrlichia ruminantium*; B - Célula endotelial em esfregaço cerebral de caprino contendo mórcula de *Ehrlichia ruminantium* (Adaptado de <http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/disease-images.php?name=heartwater&lang=en>).

3.2.4.1. Ciclo de vida e transmissão

Os organismos de *Ehrlichia ruminantium* desenvolvem-se inicialmente nas células epiteliais intestinais das carraças e, subseqüentemente, invadem e desenvolvem-se nas células das suas glândulas salivares. O hospedeiro vertebrado é infetado por bactérias presentes nas glândulas salivares da carraça durante a sua repleção. No entanto, ainda não se conhece bem o ciclo de vida do organismo e a infeciosidade de estádios sucessivos da carraça (Marcelino *et al.*, 2012).

No hospedeiro vertebrado a multiplicação é bifásica; *Ehrlichia ruminantium* divide-se por divisão binária de corpos reticulados, enquanto os corpos elementares constituem o seu estágio infeccioso. A sua replicação ocorre nas células reticuloendoteliais dos linfonodos, sendo que a rutura dessas células liberta corpos elementares que infetam células endoteliais. Nos estádios iniciais da infeção, *Ehrlichia* spp. transita entre células através de protusões celulares, conseguindo deste modo sair da célula infetada e entrar na célula vizinha, não infetada, sem entrar no espaço extracelular e, assim, permitir a evasão do sistema imunitário do hospedeiro. A entrada nas células endoteliais é feita através de um processo semelhante à fagocitose, formando-se um vacúolo, onde se multiplica e leva à rutura das células para continuar o seu ciclo (Allsopp, 2010; Moumène & Meyer, 2016).

Na Figura 42 está representado o ciclo de vida de *Ehrlichia ruminantium*.

As carraças do género *Amblyomma* são carraças de três hospedeiros e são infetadas durante os estádios larval e ninfal quando se alimentam em hospedeiros infetados. As carraças nos estádios de ninfas e adultos, transmitem *Ehrlichia ruminantium* a hospedeiros suscetíveis sem perder sua condição infecciosa (Marcelino *et al.*, 2012). Spickler (2015) refere que as carraças podem ficar infetadas durante pelo menos 15 dias.

Após a fixação ao hospedeiro a carraça infeta-o em um a dois dias, ou em dois a três dias, conforme se está no estado de ninfa ou adulto, respetivamente (Constable *et al.*, 2017).

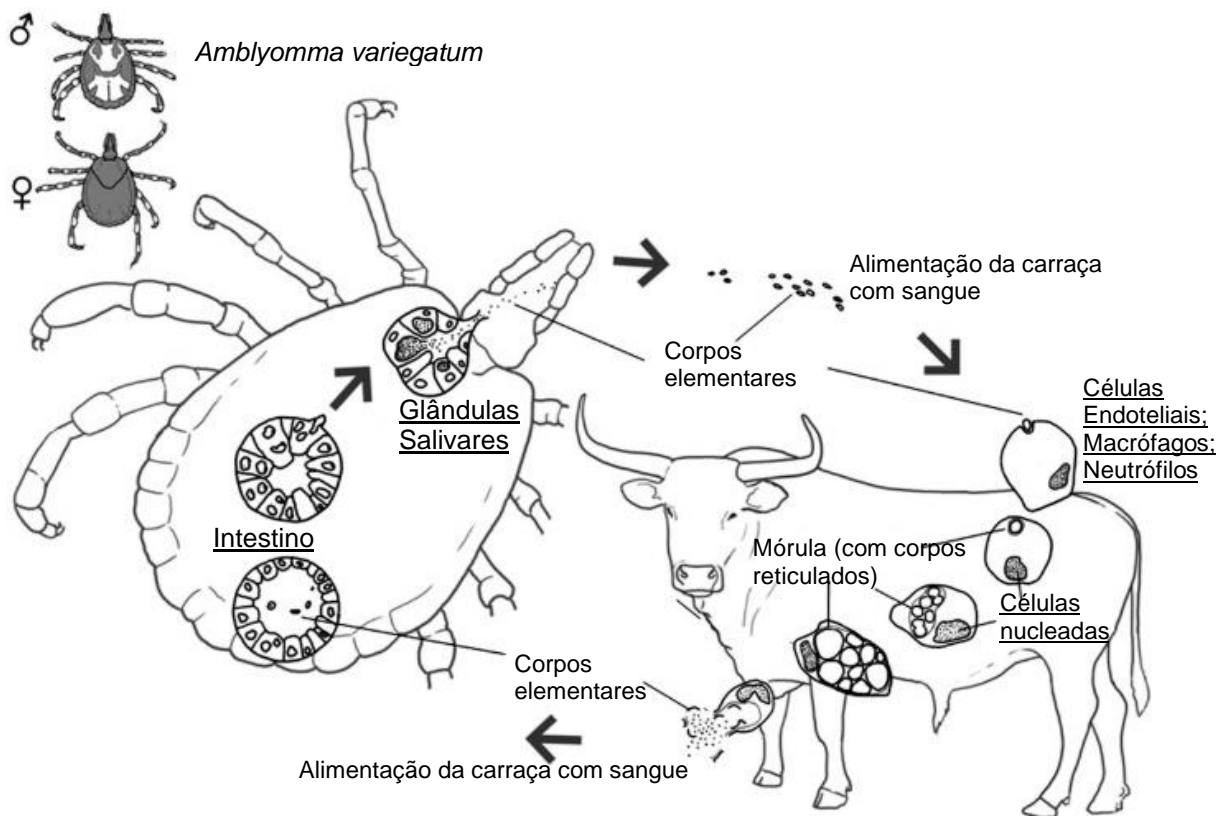


Figura 42: Ciclo de vida de *Ehrlichia ruminantium* (Adaptado de Marcelino et al., 2012).

A transmissão transtadial foi demonstrada, mas a transmissão transovárica foi relatada apenas uma vez e em condições de laboratório, não havendo provas da sua ocorrência em infecções naturais (Marcelino et al., 2012; Spickler, 2015).

As principais espécies de carrças transmissoras de *Ehrlichia* spp. estão enumeradas na Tabela 22.

Pensa-se que a transmissão vertical de *Ehrlichia ruminantium* seja possível, uma vez que já foi encontrada em amostras de colostro (Allsopp, 2010; Spickler, 2015). A transmissão iatrogénica, como já foi referida para os restantes agentes, pode também ser possível, no entanto, é menos provável uma vez que o agente é muito frágil e não sobrevive fora de um hospedeiro por mais de algumas horas a temperatura ambiente, embora existam relatos de que resista durante 72 horas a 4°C. O sangue, exposto à luz solar, perde a capacidade de infetar outros hospedeiros em menos de cinco minutos (Spickler, 2015).

3.2.4.2. Resposta Imunitária e sinais clínicos

O género *Ehrlichia* possui fatores de virulência para evitar as defesas inatas do hospedeiro, incluindo a apoptose; é capaz de perturbar vias de sinalização, inibindo a ativação de macrófagos por interferões e interleucinas, conseguindo tirar proveito das células hospedeiras. A imunidade contra erliquiose está relacionada com a capacidade dos linfócitos de animais infetados produzirem IFN- γ , que irá ativar macrófagos. São as respostas pró-inflamatórias contra *Ehrlichia* spp. que levam à erliquiose fatal. (Moumène & Meyer, 2016; Constable et al., 2017).

O período de incubação em infecções naturais é de aproximadamente 18 dias em bovinos, podendo surgir alguns sinais clínicos ligeiros até à quarta ou quinta semana após a exposição ao agente (Spickler, 2015).

Raramente são observados casos superagudos de erliquiose, sendo geralmente relatados em raças não autóctones, estes caracterizam-se por morte súbita, que pode ser acompanhada por convulsões terminais, precedida por um breve intervalo de febre, dificuldade respiratória grave, hiperestesia e lacrimejamento, e em certos casos diarreia. A forma aguda da doença é a mais comum, os sinais presentes incluem: febre repentina, anorexia, mucosas congestionadas e sinais respiratórios, como tosse húmida, estertores e taquipneia, que podem progredir para dispneia; alguns animais apresentam diarreia, que pode ser profusa e/ou hemorrágica; sinais neurológicos, devido a edema cerebral, ocorrem geralmente, incluindo movimentos de mastigação, protrusão da língua, blefaroespasmos, andar em círculos, movimentos em marcha, rigidez com tremores musculares e alterações comportamentais (Wagner *et al.*, 2002; Spickler, 2015; Constable *et al.*, 2017). São também encontradas transudações nas cavidades corporais e em certos órgãos, como pericárdio, pulmões e cérebro; deste modo, os sinais neurológicos ocorrem devido ao edema do cérebro; o hidropericárdio leva a disfunção cardíaca e o edema pulmonar a dificuldades respiratórias (Wagner *et al.*, 2002). Animais com a forma aguda da doença geralmente morrem numa semana. Nos estádios terminais são comuns: o decúbito lateral com movimentos de pedalagem, opistótonos, hiperestesia, nistagmo e espuma na boca. A erliquiose também pode apresentar-se na forma subaguda com sinais mais brandos, como: febre prolongada, tosse e falta de coordenação motora discreta. Os sinais neurológicos são inconsistentes nesta forma, sendo uma forma rara (Spickler, 2015). A maioria dos animais recupera de uma forma lenta, sendo que o curso da doença é prolongado, podendo a febre durar mais de 10 dias (Wagner *et al.*, 2002). O estado portador varia entre um a dois meses até mais de um ano, após infecções naturais ou experimentais, ficando imunes durante seis meses a quatro anos (Allsopp, 2010; Spickler, 2015; Constable *et al.*, 2017). Animais com menos de três semanas de idade, ou afetados com estirpes de baixa virulência, ou que possuem alguma resistência natural, ou imunidade parcial, não apresentam sinais clínicos (Wagner *et al.*, 2002).

A mortalidade pode ser superior a 60% em raças exóticas, mas abaixo dos 5% em animais autóctones (Taylor *et al.*, 2016).

3.3. Lesões *post mortem*

As lesões encontradas variam consoante a espécie causadora de doença e o curso da doença. Na

Tabela 23 estão apresentadas algumas das lesões *post mortem* encontradas na babesiose, theileriose, anaplasmosse e erliquiose bovina.

Tabela 23: Lesões post mortem de babesiose, theileriose, anaplasmosse e erliquiose bovina (Adaptado de Taylor et al., 2016; Constable et al., 2017; Gharbi et al., 2017; Spickler, 2018; Spickler, 2019).

| Doença | Lesões <i>post mortem</i> encontradas |
|-------------------------|---|
| Babesiose | Carcaça emaciada, icterícia, sangue “fino e aquoso”, fásia intermuscular edematosa, tecidos pálidos; |
| | Coagulação intravascular; |
| | Petéquias subepicárdicas e subendocárdicas, hidropericárdio; |
| | Edema e congestão pulmonar; |
| | Linfadenomegália; |
| | Esplenomegalia, baço com uma consistência friável e pulposa e escuro; |
| | Fígado castanho-amarelo, distensão da vesícula biliar e hemorragia da superfície da mucosa, bílis com material semi-sólido ou espessa e escura; |
| | Mucosa abomasal e intestinal ictérica com hemorragias na subserosa; |
| | Rins vermelho-escuro ou pretos e edematosos; |
| | Bexiga pode conter urina de cor normal ou escura avermelhada. |
| Theileriose | Hemorragias disseminadas; |
| | Carcaça emaciada, anêmica e ictérica; |
| | Flacidez do coração com petéquias no epicárdio e endocárdio, hidropericárdio; |
| | Hidrotórax; pulmões congestionados e edemaciados; |
| | Linfadenomegália com atrofia do conteúdo celular; os linfonodos podem apresentar-se edematosos e hemorrágicos; |
| | Esplenomegalia; |
| | Hepatomegalia, fígado friável e com coloração castanho-amarelada, vesícula biliar distendida contendo bílis espessa de cor verde; |
| | Rins congestionados, com enfartes ou com coloração castanha pálida; acumulação de líquido seroso no interior da cápsula renal; |
| | Úlceras no abomaso, intestino delgado e grosso, conteúdo intestinal amarelado; |
| | Pequenos nódulos linfóides no fígado, rins, trato digestivo e cutâneos; |
| | Pulmões hiperêmicos e cheios de fluido, presença de exsudato na traqueia e brônquios; |
| | Petéquias na pleura visceral e parietal, córtex adrenal, bexiga e mediastino; |
| | Petéquias na mucosa conjuntival; |
| Congestão das meninges. | |

| | |
|--------------|---|
| Anaplasmosse | Icterícia, palidez dos tecidos; |
| | Linfadenomegalia, congestão dos linfonodos; |
| | Esplenomegalia; |
| | Hepatomegalia, coloração alaranjada do fígado, congestão hepática, colestase, aumento da vesícula biliar; |
| | Cavidade da medula óssea avermelhada; |
| | Petéquias no epicárdio, pericárdio, pleura e diafragma. |
| Erlíquiose | Linfadenomegalia mediastinal e brônquica; |
| | Petéquias no epicárdio e endocárdio, hidropericárdio; |
| | Hidrotórax, edema pulmonar com fluidos traqueais e brônquicos; |
| | Esplenomegalia; |
| | Congestão intestinal; |
| | Hepatomegalia, vesícula biliar distendida; |
| | Congestão cerebral e de vasos sanguíneos meníngeos. |

3.4. Diagnósticos Diferenciais

Com base nos sinais clínicos comuns apresentados pelos diferentes quadros clínicos, estão apresentados alguns dos diagnósticos diferenciais de babesiose, theileriose, anaplasmosse e erlíquiose bovina, na Tabela 24.

Tabela 24: Diagnósticos diferenciais de babesiose, theileriose, anaplasmosse e erlíquiose bovina (Adaptado de Taylor et al., 2016; Constable et al., 2017).

| Doença | Diagnósticos Diferenciais |
|-------------|--|
| Babesiose | Theileriose; |
| | Hemoglobinúria pós-parto; |
| | Hemoglobinúria bacilar; |
| | Intoxicação por S-Metil-L-Cisteína-Sulfoxide (SMCO); |
| | Leptospirose. |
| Theileriose | Tripanossomose; |
| | Babesiose; |
| | Anaplasmosse; |
| | Erlíquiose; |
| | Febre Catarral Maligna; |
| | Diarreia Viral Bovina; |
| | Peste Bovina; |
| | Diferentes theilerioses; |
| | Linfoma. |

| | |
|--------------|--------------------------------|
| Anaplasmosse | Leptospirose; |
| | Hemoglobinúria pós-parto; |
| | Babesiose; |
| | Intoxicação crónica por cobre; |
| | Theileriose. |
| Erlíquiose | Carbúnculo hemático; |
| | Raiva; |
| | Tétano; |
| | Botulismo; |
| | Anaplasmosse; |
| | Babesiose cerebral; |
| | Theileriose cerebral; |
| | Meningite; |
| | Encefalite; |
| | Hipomagnesiemia; |
| | Listeriose. |

3.5. Diagnóstico

O diagnóstico da infeção por *Babesia* spp., *Theileria* spp., *Anaplasma* spp. e *Ehrlichia* spp. pode ser feito através de métodos que detetam o organismo ou através de métodos serológicos, podendo ser utilizados de forma isolada ou em combinação (Mans *et al.*, 2015; Alvarez, 2019).

Os métodos referidos de identificação de organismos são:

- Observação microscópica;
- Reação de polimerase em cadeia (PCR);
- Subinoculação;
- Cultura *in vitro*.

Os testes serológicos podem ser utilizados para demonstrar a exposição dos animais ao agente, assim como a transferência de anticorpos pelo colostro em vitelos (Alvarez *et al.*, 2019). Estes testes, além de apresentarem dificuldade na execução e morosidade, são considerados testes com uma baixa especificidade, devido à reatividade cruzada de antígenos e enfraquecimento da resposta imune específica a longo prazo, pelo que não são testes fiáveis para detetar animais portadores (Noaman, 2012; Rojas-Martínez *et al.*, 2018).

Os testes serológicos referidos são:

- Teste indireto de fluorescência de anticorpos (IFAT);
- Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA);
- Teste de fixação do complemento (CFT);
- Teste de aglutinação em cartão (CAT);

- Imunocromatografia (ICF).

Apesar da anamnese, dos sinais clínicos, das lesões e da resposta ao tratamento serem indicativas de babesiose, theileriose, anaplasmoses e erliquiose, um diagnóstico definitivo só é alcançado através de métodos laboratoriais, sendo de salientar a elevada frequência de infecções mistas (Almeria *et al.*, 2001; Georges *et al.*, 2001; Spickler, 2013)

3.5.1. Identificação do organismo

3.5.1.1. Observação microscópica

Os esfregaços sanguíneos são obtidos a partir de sangue periférico e corados pelo método de *Giemsa* e, observados ao microscópio ótico com uma ampliação de 1000x utilizando óleo de imersão (Homer *et al.*, 2000; Zintl *et al.*, 2003; Gharbi *et al.*, 2017; Peter *et al.*, 2019).

A sensibilidade e a especificidade na identificação do parasita com base no exame microscópico de esfregaços sanguíneos dependem muito da experiência e proficiência do examinador (Lempereur *et al.*, 2017). Além disso, nos casos em que está presente um reduzido número de hemoparasitas, resulta em falso-negativos, como é o caso dos animais portadores, além de que, por vezes a dificuldade na identificação das diferentes espécies pela sua morfologia pode levar a erros, especialmente em casos de infecções mistas (Almeria *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2014).

No caso de *Babesia* spp., pesquisam-se formas intraeritrócitárias; de *Theileria* spp. o diagnóstico é efetuado a partir da presença de formas intraeritrócitárias ou de formas intralinfocitárias, esquizontes ou Corpos Azuis de Koch; de *Anaplasma marginale* e *A. centrale* podem observar-se os corpos de inclusão nos eritrócitos, e mórulas intracitoplasmáticas em leucócitos em *A. bovis* e *A. phagocytophilum*; de *Ehrlichia* spp. detetam-se os corpos de inclusão nos leucócitos (Homer *et al.*, 2000; Kocan *et al.*, 2003; Lempereur *et al.*, 2017; Spickler, 2019). No caso de espécies que se acumulam em capilares, de que é exemplo *Babesia bovis* podem também ser encontradas em esfregaços de certos órgãos, como cérebro, baço, fígado ou rins; nas espécies pertencentes ao género *Theileria* podem ser identificadas também em esfregaços obtidos a partir de linfonodos, fígado ou baço (Lempereur *et al.*, 2017).

Em relação a *Ehrlichia ruminantium*, o diagnóstico é facilitado quando após a morte do animal se observam colónias típicas nos capitares do tecido cerebral, fixados em álcool metílico e corados pelo método de *Giemsa*. No entanto, é necessária experiência para diferencia-las de outros hemoparasitas, tais como *Babesia bovis*, de certas células sanguíneas, como trombócitos e granulócitos, de estruturas subcelulares normais, como mitocôndrias e grânulos de mastócitos, ou de artefactos de manchas de precipitação (Taylor *et al.*, 2016).

3.5.1.2. Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)

A técnica de PCR amplifica um único pedaço de ácido desoxirribonucleico (ADN) em milhões de cópias *in vitro*, com o objetivo de detetar a presença ou ausência de uma pequena sequência de ADN. Este método, considerado um teste de elevada especificidade e

sensibilidade, possui a capacidade de detecção de organismos em baixas infecções, sendo particularmente importante devido à sua sensibilidade na detecção de animais portadores (Almeria *et al.*, 2001; Alvarez *et al.*, 2019).

A técnica de PCR possui, assim, uma eficácia superior na detecção de organismos do que a observação ao microscópio ótico, além de permitir a discriminação das espécies entre agentes patogênicos e não patogênicos, e de ser uma técnica mais rápida quando comparada com a cultura *in vitro* de organismos. As pesquisas de ADN dos agentes através desta técnica podem ser feitas tanto no hospedeiro vertebrado como nas carraças (Almeria *et al.*, 2001; Alvarez *et al.*, 2019; Zaid *et al.*, 2019).

Diversas técnicas de PCR têm sido desenvolvidas, tais como: PCR em tempo real, *nested-PCR* ou *multiplexPCR* (Mosqueda *et al.*, 2012; Alvarez *et al.*, 2019).

3.5.1.3. Subinoculação

Esta técnica permite a detecção de parasitas em animais com uma baixa carga infecciosa, portadores ou animais persistentemente infetados, através da subinoculação de sangue desses animais em vitelos esplenectomizados. Contudo, além dos custos associados, não é um método ético (Aubry & Geale, 2011; Alvarez *et al.*, 2019).

3.5.1.4. Cultura *in vitro*

A técnica de cultura *in vitro* é utilizada para demonstrar a presença de infecções em animais portadores (Alvarez *et al.*, 2019). As vantagens da sua utilização são: possibilidade do estudo da fisiologia do agente, permitir executar descrições genéticas, ver a sua suscetibilidade a fármacos, bem como, aperfeiçoar metodologias de diagnóstico (Portillo *et al.*, 2017). De uma forma generalista, esta metodologia é apenas utilizada em procedimentos de estudo e não rotineiramente, devido à sua complexidade e morosidade (Alvarez *et al.*, 2019).

3.5.2. Métodos serológicos

3.5.2.1. Teste Indireto de Fluorescência de Anticorpos (IFAT)

O método de IFAT é baseado no reconhecimento de antígenos parasitários por anticorpos séricos no sangue do animal testado. Os anticorpos ligados aos antígenos são detetados por um anticorpo anti-imunoglobulina marcado com um fluorocromo (anticorpo secundário) (Mosqueda *et al.*, 2012).

Este método apresenta uma boa sensibilidade, mas possui diferentes níveis de fluorescência, fluorescência inespecífica, dificuldades na padronização e subjetividade do operador. Um dos maiores problemas da utilização da técnica é a reatividade cruzada observada entre espécies intimamente ligadas (Vidotto & Marana, 2001; Mans *et al.*, 2015). As vantagens da sua utilização são: detecção precoce de anticorpos, simplicidade, mais económico e menor tempo de consumo (Alvarez *et al.*, 2019).

3.5.2.2. Ensaio de Imunoabsorção enzimática (ELISA)

O método de ELISA deteta e qualifica a presença de anticorpos em baixas concentrações (Vidotto & Marana, 2001).

Inicialmente, o método de ELISA era realizado utilizando antigénio purificado em bruto, mas existia uma elevada reatividade cruzada com proteínas séricas. Métodos mais recentes incluem a utilização de antigénios recombinantes e anticorpos monoclonais, aumentando a especificidade, através da utilização de proteínas patogénicas antigénicas ligadas aos poços de ELISA que são utilizadas para a deteção de anticorpos anti-agente utilizando uma anti-imunoglobulina G (IgG) conjugada com uma enzima, geralmente peroxidase (Mosqueda *et al.*, 2012). Existem diferentes tipos de testes de ELISA tais como: ELISA competitivo, ELISA indireto e *dot*ELISA (Aubry & Geale, 2011).

As vantagens da utilização de ELISA perante IFAT são: a interpretação menos subjetiva dos resultados e a facilidade de automatização para um grande número de amostras, no entanto, apresenta uma especificidade inferior (Zintl *et al.*, 2003).

3.5.2.3. Teste de Fixação do Complemento (CFT)

O método de CFT é dependente da presença de anticorpos fixadores do complemento, essencialmente imunoglobulina M (IgM), pelo que possibilita a deteção de infeções precoces, não sendo indicado para detetar animais infetados cronicamente (Alvarez *et al.*, 2019). O teste de fixação do complemento possui uma especificidade muito alta, no entanto, possui uma baixa sensibilidade, pelo que não deve ser utilizado para a deteção de doença em animais individuais (Chung *et al.*, 2014)

3.5.2.4. Teste de Aglutinação em Cartão (CAT)

O método de CAT é executado num cartão de teste onde se coloca fator de soro bovino, o soro para testar e antigénio específico contra o agente. É efetuado através da avaliação da presença de aglomeração e, caso esta não ocorra o teste é considerado negativo (OIE, 2019).

O método de CAT é um teste sensível, que pode ser realizado no campo e que possibilita a obtenção de resultado em alguns minutos, no entanto, pode ser difícil preparar a suspensão de antigénio (OIE, 2019).

3.5.2.5. Imunocromatografia (ICT)

O método de ICT deteta anticorpos contra um antigénio específico numa pequena quantidade de soro, ambos impregnados numa tira baseada numa membrana de nitrocelulose; é um teste rápido e sensível, podendo ser executado a campo (Mosqueda *et al.*, 2012; Alvarez *et al.*, 2019).

Na Tabela 25 estão referidos alguns métodos de diagnóstico, bem como a sua finalidade consoante a recomendação da Organização Mundial da Saúde Animal (OIE).

Tabela 25: Métodos de diagnóstico de *Babesia spp.*, *Theileria spp.* e *Anaplasma spp.* bovinas e a sua finalidade (Adaptado de OIE, 2019).

| Agente | Método | Finalidade | | | | | |
|------------------------------|-------------------------|-----------------------------|--|--|-------------------------------|------------------------------------|---|
| | | População livre de infecção | Animal livre de infecção antes de movimentação | Contributo para políticas de erradicação | Confirmação de casos clínicos | Prevenção de infecção – vigilância | Estado imunitário de animais ou populações após vacinação |
| <i>Babesia spp.</i> | Observação microscópica | - | + | - | +++ | - | - |
| | PCR | - | +++ | - | +++ | - | - |
| | CFT | - | - | - | - | - | + |
| | ELISA | +++ | + | +++ | - | +++ | +++ |
| | IFAT | + | - | - | - | ++ | +++ |
| <i>Theileria spp.</i> | Examinação microscópica | - | +++ | - | +++ | - | - |
| | PCR | + | ++ | ++ | +++ | + | - |
| | ELISA | + | + | ++ | - | +++ | - |
| | IFAT | + | +++ | ++ | - | +++ | - |
| <i>Anaplasma spp.</i> | Examinação microscópica | - | + | - | +++ | - | - |
| | PCR | - | +++ | - | +++ | - | - |
| | CAT | - | - | - | - | + | + |
| | ELISA | +++ | + | +++ | - | +++ | +++ |
| | IFAT | + | - | - | - | ++ | ++ |
| | CFT | - | - | - | - | + | - |

Chave: +++ = método recomendado; ++ = método adequado; + = pode ser utilizado em algumas situações, mas o custo, a fiabilidade ou outros fatores limitam severamente a sua aplicação; - = não apropriado para a finalidade.

3.6. Controlo

A incidência de doenças em bovinos provocadas por agentes transmitidos por carraças tem vindo a aumentar devido a alguns fatores, como: inexistência de vacinas eficazes disponíveis, expansão geográfica dos vetores transmissores, alterações climáticas, intervenções humanas e resistência a acaricidas, bem como, pela a transmissão resultante de animais selvagens infestados com carraças (Gallego-Lopez *et al.*, 2019; Suarez *et al.*, 2019).

A compreensão do ciclo de vida dos parasitas é indispensável na implementação de estratégias de controlo, assim como para identificar novas estratégias de intervenção (Nene *et al.*, 2016). A deteção de animais portadores de infeções subclínicas é essencial para estimar o risco apresentado pelos agentes patogénicos (Elsify *et al.*, 2015).

Apesar da disponibilidade e do uso de vacinas vivas que, em alguns países, compreendem o uso de microorganismos atenuados, as doenças provocadas por agentes transmitidos por carraças permanecem pouco controladas, confirmando a necessidade urgente de novas vacinas para impedir o desenvolvimento de doenças agudas e a expansão dos agentes em áreas não endémicas (Suarez *et al.*, 2019).

Algumas das formas de controlo de doenças provocadas por agentes transmitidos por carraças disponíveis são:

- Manutenção dos efetivos livres de infeção;
- Acaricidas;
- Administração profilática de antibióticos;
- Controlo mecânico;
- Estabilidade Endémica Natural;
- Vacinas.

3.6.1. Manutenção dos efetivos livres de infeção

Aubry & Geale (2011) referem que um dos métodos de controlo de anaplasrose é a manutenção dos efetivos livres de doença, através da testagens de todos os animais, bem como dos novos animais inseridos no efetivo; em caso de resultados positivos, os animais devem ser imediatamente eliminados ou, alternativamente, devem ser tratados e testados novamente para verificar se eliminaram o estado portador. Uma vez que o diagnóstico poderá ter um falso-negativo, os animais inseridos no grupo devem, idealmente, ser provenientes de efetivos sem a doença. Também de modo a aumentar o rigor, os animais devem, ser testados duas vezes com um intervalo de três semanas, sem que ocorra o risco de infeção durante esse período. É uma medida especialmente importante em áreas onde a prevalência de infeção é baixa (Aubry & Geale, 2011). Esta medida, referida como método de controlo de anaplasrose, deve ser transposta para as restantes doenças referidas no presente trabalho.

3.6.2. Acaricidas

A utilização de acaricidas constitui a base da prevenção das doenças provocadas por agentes transmitidos por carraças. No entanto, o uso de acaricidas previne apenas parcialmente a ocorrência de doença, uma vez que, além deste modo de infeção, existe a possibilidade de transmissão mecânica, acrescido ao facto de os acaricidas não conseguirem eliminar totalmente as carraças (Kocan *et al.*, 2003; Spickler, 2013).

Os acaricidas possuem diversos efeitos negativos, nomeadamente: efeito residual no leite e na carne, contaminação ambiental e o seu uso recorrente é responsável pelo aumento de resistências, associadas a mutações nos genes relacionados com a suscetibilidade a fármacos (Domingos *et al.*, 2013). Assim, devem ser consideradas a suscetibilidade / resistência de forma a obter sucesso no procedimento (Almazan, 2018). Podem ainda interferir na estabilidade endémica, tornando os animais suscetíveis à doença (Quiroz-Castañeda *et al.*, 2016).

Os organofosfatos, organocloretos, piretróides, amidinas, lactonas macrocíclicas e benzoilfenilureias são alguns dos acaricidas utilizados (Meneghi *et al.*, 2016; Almazan, 2018).

Para além do controlo dos ixodídeos que se encontram no hospedeiro, pode também associar-se a manutenção dos animais em ambientes não favoráveis à sobrevivência e

conclusão dos seus ciclos de vida, apesar desta medida não ser possível em todos os modos de produção (Aubry & Geale, 2011).

3.6.3. Administração profilática de antibióticos

Um dos métodos referidos como profiláticos para o controlo de doenças provocadas por agentes transmitidos por carraças consiste na utilização de antibióticos preventivamente, no entanto, o uso intensivo de antibióticos acarreta o risco inaceitável do aumento das resistências por parte dos microorganismos (Kocan *et al.*, 2010).

3.6.4. Controlo mecânico

Uma vez que a transmissão das doenças referidas ocorre através de vetores biológicos, mas também através de vetores mecânicos, o controlo mecânico deve também ser efetuado através do controlo de moscas, bem como da limpeza de todos os espaços físicos utilizados pelos animais, como: vacarias, telheiros, manjedouras, bebedouros, e todos os utensílios utilizados. A utilização de agulhas descartáveis que devem ser trocadas a cada animal, é recomendado, bem como a desinfeção de todos os instrumentos cirúrgicos e de contacto direto com os animais, como alicates de colocar brincos, arganéis, entre outros; devem também ser trocadas as luvas de palpação entre animais (Aubry & Geale, 2011).

3.6.5. Estabilidade Endémica Natural

A estabilidade endémica é definida como o estado em que a relação entre hospedeiro, agente, vetor e meio ambiente, resulta em doença clínica rara ou inexistente; no caso das doenças provocadas por agentes transmitidos por carraças ocorre quando a taxa de transmissão de agentes pelo vetor é suficiente para estimular a manutenção de imunidade antes da perda de resistência ao aparecimento de doença clínica. No entanto, a estabilidade endémica natural raramente pode ser considerada uma estratégia de controlo de doenças. Em primeiro lugar, em áreas endémicas, os efeitos climatéricos, o genótipo dos hospedeiros e as estratégias de manejo têm inevitavelmente um efeito importante na taxa de transmissão e na sua manutenção, podendo, contudo, sofrer alterações sazonais e anuais. Em segundo lugar, a estabilidade endémica é um conceito económico que incorpora a gestão de risco e o limiar de perda. A estabilidade endémica varia entre países, por exemplo, na Austrália e na América as interações vetor-doença são mais simples do que em África, onde existem mais doenças, mais vetores, reservatórios de caça e uma maior variedade de raças suscetíveis. A estabilidade endémica pode ser adquirida de forma natural, ou através da vacinação de animais com vacinas vivas (Constable *et al.*, 2017).

O uso ocasional de acaricidas ajuda na manutenção de estabilidade endémica uma vez que os animais ainda podem ser expostos a baixos níveis de infeção (Constable *et al.*, 2017).

3.6.6. Vacinas

As vacinas são o método mais económico e sustentável para prevenir e controlar doenças infecciosas em animais, para melhorar o bem-estar e diminuir o custo produtivo; além de que a implementação de programas de vacinação em massa pode contribuir para a redução da utilização de outros fármacos, diminuindo o aparecimento de resistências e o surgimento de doenças, incluindo zoonoses (Marcelino *et al.*, 2012).

O desenvolvimento de imunidade protetora está dependente de fatores relacionados com o hospedeiro, nomeadamente: idade, *stress*, infeção / vacinação concomitante e o seu genótipo (Bock & Vos, 2001).

Na tabela Tabela 26 estão representadas algumas das vacinas contra os principais agentes transmitidos por carraças causadores de doença em bovinos.

Tabela 26: Principais vacinas contra agentes transmitidos por carraças em bovinos (Adaptado de Marcelino *et al.*, 2012; Constable *et al.*, 2017).

| Agente | Vacina |
|------------------------------|---|
| <i>Babesia bovis</i> | Vacina recombinante |
| <i>Babesia bigemina</i> | Vacina viva |
| <i>Theileria annulata</i> | Vacina viva e atenuada |
| <i>Theileria parva</i> | Método de infeção e tratamento |
| <i>Anaplasma centrale</i> | Vacina viva |
| <i>Anaplasma marginale</i> | Vacina viva e vacina morta baseada em <i>Anaplasma marginale</i> ou <i>A. centrale</i> ; Vacina atenuada; Vacina morta baseada em culturas de linhas de células de carraças |
| <i>Ehrlichia ruminantium</i> | Vacina viva inativada e recombinante (baseada em ADN e proteínas) |

As vacinas, tanto vivas como mortas, reduzem ou previnem o aparecimento de doença clínica, no entanto, não previnem que os animais se tornem persistentemente infetados (Kocan *et al.*, 2003).

O uso de vacinas vivas à base de parasitas atenuados é o pilar para controlar a babesiose bovina em diversos países, como Austrália, Israel e Argentina. No entanto, a produção de vacinas vivas é oneroso, além de possuírem muitas limitações, como a necessidade de uma cadeia de frio, possibilidade de contaminação com outros agentes infecciosos, alto risco de reversão à virulência, uma vida útil curta, entre outros (Suarez & Noh, 2011; Suarez *et al.*, 2019). Contudo, embora não estejam disponíveis vacinas de subunidade mais seguras, elas são o método mais sustentável e desejável para o controlo da babesiose bovina (Suarez *et al.*, 2019). As vacinas de subunidades recombinantes contra parasitas de *Babesia* spp. poderiam, potencialmente, atingir vários pontos do ciclo de vida do parasita, em múltiplos estádios: as proteínas expressas na superfície de esporozoítos, merozoítos, ou na superfície de eritrócitos infetados são

consideradas alvos-chave para o desenvolvimento de vacinas para o estágio sanguíneo, enquanto as proteínas envolvidas no desenvolvimento do parasita no estágio sexual são consideradas alvos-chave para o desenvolvimento futuro de vacinas antiparasitas no estágio da carraça, para impedir a transmissão do parasita para os hospedeiros (Rathinasamy *et al.*, 2019).

Outro aspecto negativo da utilização de vacinas vivas é referido por Nene & Morrison (2016) em relação a *Theileria annulata*, onde mencionam que a utilização de vacinas vivas provenientes de outros países leva à introdução de estirpes parasitárias de diferente virulência e capacidade antigénica. Como é referido na Tabela 26, em relação a *Theileria parva*, utiliza-se o método de infeção e tratamento, no qual se administra uma dose de vacina viva potencialmente letal de parasita e se procede ao tratamento do animal com oxitetraciclina de longa ação ou, preferencialmente, parvaquona. No entanto, têm sido desenvolvidos estudos com vista à utilização de isolados de baixa patogenicidade ou de esporozoítos com baixa infeciosidade; contudo, um dos principais problemas demonstrado é a formação de imunidade para estirpes únicas, pelo que, uma das soluções que tem vindo a ser estudada é a utilização de vacinas vivas compostas, sendo a mais utilizada a vacina trivalente *cocktail de Muguga*, no entanto, esta vacina contém uma diversidade genotípica e antigénica relativamente limitada (Constable *et al.*, 2017; Steinaa *et al.*, 2018; Bishop *et al.*, 2020; Morrison *et al.*, 2020).

As abordagens convencionais de vacinologia que resultam em vacinas vivas ou vivas atenuadas para anaplasiose podem transmitir outros agentes patogénicos presentes no sangue, como é o caso de *Anaplasma centrale*. Deste modo, não podem ser utilizadas em países onde o organismo está ausente, uma vez que acarretam o risco inerente de transmitirem parasitas a animais não vacinados que partilhem a mesma pastagem e de introduzirem novos agentes (Quiroz-Castañeda *et al.*, 2016).

Apesar da sua importância veterinária, atualmente não existe uma vacina totalmente eficaz para qualquer uma das doenças provocadas por agentes transmitidos por carraças (Marcelino *et al.*, 2012). Um dos problemas encontrados no controlo dessas doenças está relacionado com a elevada diversidade antigénica e genética encontradas nas estirpes de uma região para outra, dentro do mesmo grupo de animais e até dentro do mesmo animal (Quiroz-Castañeda *et al.*, 2016). Exemplo disto é a fraca eficácia das vacinas contra *Ehrlichia ruminantium* que além de uma ampla variedade genómica e com diferentes capacidades de proteção cruzada, geralmente circulam em simultâneo na mesma região (Constable *et al.*, 2017).

Atualmente, os novos avanços na pesquisa de vacinas são cada vez mais dependentes das novas abordagens “omics”, que incorporam tecnologias de alto rendimento, como: genómica, proteómica, transcriptómica, metabolómica, imunómica e vacinómica, que irão contribuir para superar lacunas no conhecimento sobre a função das principais moléculas de agentes envolvidos na invasão celular, adesão, reprodução assexuada e sexual e transmissão por carraças (Marcelino *et al.*, 2012).

Idealmente, uma nova vacina deverá conter antígenos do agente patogénico e do vetor para evitar, simultaneamente, a transmissão dos agentes e controlar as infestações por carraças.

Essa vacina aumentaria a produtividade, reduziria os custos de controlo de carraças e melhoraria o bem-estar das população locais em regiões suscetíveis (Marcelino *et al.*, 2012).

Outras abordagens futuras para o controlo destas doenças são o desenvolvimento de vacinas anti-carraças, já disponíveis em alguns países (Almazan, 2018). As vacinas bloqueadoras de transmissão que interferem em aspetos específicos da fisiologia da carraça (importantes para a sobrevivência ou desenvolvimento de artrópodes), podem prevenir infeções múltiplas que são frequentemente co-transmitidas por uma única espécie de carraça, conferindo uma vantagem sobre vacinas que visam apenas agentes patogénicos específicos (Merino *et al.*, 2013).

3.7. Tratamento

O sucesso de tratamento depende de um diagnóstico precoce, da correta administração de fármacos efetivos, bem como da sua conservação (Mosqueda *et al.*, 2012; Suarez *et al.*, 2019).

Nos casos severos, além de fármacos específicos para o tratamento da doença devem ser usadas terapias de suporte: transfusões de sangue, fármacos anti-inflamatórios, acaricidas, suplementação com ferro, dextrose, vitaminas (complexo B), diuréticos e restituição de fluidos (Mosqueda *et al.*, 2012).

Quando se efetua o tratamento de um animal deve ter-se em atenção se a doença tem origem numa vacinação com vacina viva, de modo a não provocar uma eliminação completa do agente antes da produção de anticorpos séricos suficientes para obter uma imunidade duradoura. Contudo, o tratamento do animal não tem efeito supressor sobre os organismos que residem nas carraças que o parasitam (Constable *et al.*, 2017).

Alguns estudos demonstram que as estratégias baseadas na combinação de quimioterápicos são significativamente mais efetivas para a eliminação de parasitas e, principalmente, resultam num menor risco de desenvolvimento de resistência a fármacos, do que a aplicação de uma única terapia medicamentosa, além de diminuir a dosagem; devem ser escolhidos fármacos com mecanismos de ação distintos de forma a tornar os seus efeitos sinérgicos (Suarez *et al.*, 2019)

O surgimento de resistências a fármacos em agentes patogénicos é um grande desafio para o tratamento bem-sucedido de doenças infecciosas e tem sérias implicações no tratamento de casos clínicos, levando ao aumento da morbidade. Nas últimas décadas, os parasitas protozoários desenvolveram diversas resistências por meio de vários mecanismos, como: alterações genéticas nos locais alvo, redução de captação e aumento de efluxo de substâncias ativas e regulação metabólica (Tuvshintulga *et al.*, 2019).

Pretende-se que sejam desenvolvidos novos fármacos com efeito quimioterápico, contra as doenças provocadas por agentes transmitidos por carraças, com alta especificidade para os agentes e com baixa toxicidade para os hospedeiros (Mosqueda *et al.*, 2012), referindo-se, de seguida, alguns fármacos utilizados no tratamento destas doenças.

3.7.1. Fármacos para tratamento de babesiose

Para o tratamento de babesiose o diminazeno aceturato e o dipropionato de imidocarb são os mais utilizados (Bock *et al.*, 2004; Mosqueda *et al.*, 2012; Suarez *et al.*, 2019).

O diminazeno aceturato possui uma rápida eficácia contra *Babesia bovis* e *B. bigemina*, na dose de 3,4 mg/kg por via intramuscular, sendo bem tolerado e protegendo os animais por 2 e 4 semanas, respetivamente (Bock *et al.*, 2004).

O dipropionato de imidocarb é utilizado por via subcutânea na dose de 1,2 mg/kg, enquanto a dose de 2 mg/kg fornece proteção contra *Babesia bovis* por 4 semanas e pelo menos 2 meses para *B. bigemina*. Qualquer dose de dipropionato de imidocarb pode interferir com o desenvolvimento de imunidade após a vacinação dos animais com uma vacina viva, no entanto, apenas doses altas eliminam os parasitas de *Babesia bovis* e *B. bigemina* dos animais portadores. Deste modo, a dose referida como protetora contra a infeção clínica, permite que ocorra uma infeção subclínica à medida que os níveis séricos diminuem, resultando em imunidade (Bock *et al.*, 2004; Taylor *et al.*, 2016). O uso de dipropionato de imidocarb pode apresentar efeitos secundários, tais como: salivação, vômito, diarreia e inflamação no local da injeção; além de que o uso prolongado desses fármacos resulta no surgimento de parasitas resistentes (Silva *et al.*, 2018).

O tratamento com oxitetraciclina de longa ação, após a vacinação, reduz significativamente a parasitemia e a destruição de eritrócitos sem inibir o desenvolvimento de imunidade; no entanto, a oxitetraciclina, geralmente, é incapaz de controlar infeções virulentas no campo (Bock *et al.*, 2004).

A utilização de tulatromicina tem sido estudada para o tratamento de babesiose, através da inibição do crescimento do parasita, contudo, a dose de tratamento de *Babesia bovis* é três vezes superior à dose de tratamento de *B. bigemina* (Silva *et al.*, 2018)

Outro fármaco referido como agente no tratamento de *Babesia bovis* é a clofazimina (Tuvshintulga *et al.*, 2019). Existem ainda evidências do efeito inibitório de fluoroquinolonas contra babesiose (Rizk *et al.*, 2018). Alguns dos fármacos utilizados em laboratório são: nerolidosol, artesunato, tricolasan, epoxomicina, gossypol, atavaquona, n-acetil-L-cisteína e 17-dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-DMAG), dos quais se tem estudado as associações de diminazeno aceturato com atavaquona e de diminazeno aceturato com 17-DMAG (Mosqueda *et al.*, 2012; Suarez *et al.*, 2019).

3.7.2. Fármacos para o tratamento de theileriose

Quando um animal manifesta sinais clínicos de infeção por *Theileria parva*, o tratamento, geralmente, é considerado insatisfatório ou demasiado dispendioso. Durante muitos anos o tratamento recomendado baseou-se em tetraciclina, no entanto, estas têm demonstrado uma eficácia moderada, especialmente quando a doença está presente há alguns dias (Constable *et al.*, 2017).

Os fármacos que têm demonstrado maior sucesso são: parvaquona (duas doses, com 48 horas de intervalo, de 10 mg/kg, por via intramuscular), buparvaquona (duas doses, com 48 horas de intervalo, de 2,5 mg/kg, por via intramuscular), lactato de halofuginona (duas doses de 1,2 mg/kg, por via oral), ou oxitetraciclina (na dose de 20 mg/kg), sendo a última menos eficiente. Quando estes fármacos não são utilizados na dose correta os animais recuperados podem tornar-se portadores (Constable *et al.*, 2017).

No tratamento de *Theileria orientalis* tem sido efetivo o uso de buparvaquona, tendo também sido reportado o uso de tetrocarcina-A (Watts *et al.*, 2016).

3.7.3. Fármacos para o tratamento de anaplasmosose

O tratamento contra a anaplasmosose é feito através da utilização de tetraciclina, dipropionato de imidocarb ou enrofloxacina (Constable *et al.*, 2017).

Em caso de doença clínica pode efetuar-se o tratamento com oxitetraciclina, na dose de 6 a 10 mg/kg, durante três dias, ou uma administração única na dose de 20 mg/kg, por via intramuscular, no entanto, os animais persistem como portadores. A utilização de dipropionato de imidocarb não elimina também o estado de portador, são utilizadas duas administrações na dose de 5 mg/kg, por via intramuscular, com sete dias de intervalo. Outra opção para o tratamento de anaplasmosose é o uso de enrofloxacina, através de duas administrações na dose de 12,5 mg/kg, com 48 horas de intervalo, contudo, os animais continuam também portadores (Constable *et al.*, 2017). Sugere-se que a utilização de enrofloxacina tem um efeito *rickettsida*, uma vez que diminui os níveis de bacteriemia. Outros estudos relatam que uma dose única de 7,5 mg/kg pode ser eficaz no tratamento de anaplasmosose aguda, sendo os resultados mais eficazes do que com a utilização de oxitetraciclina (Facury-Filho *et al.*, 2012).

3.7.4. Fármacos para o tratamento de erliquiose

As infeções por *Ehrlichia ruminantium* são difíceis de tratar com sucesso uma vez que os fármacos disponíveis são apenas eficazes nos estádios febris precoces, antes do aparecimento de sinais neurológicos (Constable *et al.*, 2017).

Nos estádios iniciais, as tetraciclina de ação curta, como a oxitetraciclina, na dose de 10 a 20 mg/kg, ou doxiciclina, na dose de 2 mg/kg, e as de ação longa em doses reduzidas são eficazes. As sulfonamidas (por exemplo, sulfametazina) também podem ser utilizadas nos estádios iniciais, mas apresentam uma eficácia mais reduzida (Constable *et al.*, 2017).

3.8. Perdas económicas

Babesiose, theileriose e anaplasmosose são as principais doenças provocadas por agentes patogénicos transmitidos por carrças, e levam a elevadas perdas económicas na produção pecuária mundialmente, dependendo, em grande parte da sua epizootiologia (Gray, 1985; Hurtado & Giraldo-Ríos, 2019).

As carrças afetam 80% da população bovina mundial e os seus impactos económicos na produção animal estão relacionados com a epidemiologia da doença, podendo ser classificados

em perdas diretas e perdas indiretas. Nas perdas diretas estão incluídos (Hurtado & Giraldo-Ríos, 2019):

- Danos nas peles pelas picadas;
- Perdas sanguíneas associadas a elevada parasitemia;
- Reações imunológicas graves pela inoculação de toxinas;
- *Stress* permanente que altera o comportamento e o bem-estar animal.

Nas perdas indiretas incluem-se (Yusuf, 2017; Hurtado & Giraldo-Ríos, 2019):

- Hemoparasitoses, e outras doenças;
 - Mortalidade;
 - Restrições de movimentação de animais;
 - Redução na produção de leite e carne;
- Custo do tratamento de casos clínicos;
- Despesas no controlo de carraças;
- Ineficiência no sistema de produção;
- Retenção de resíduos de acaricidas na carne e no leite;
- Restrições comerciais de animais entre áreas e países.

4. Pesquisa de agentes transmitidos por ixodídeos em bovinos assintomáticos na ilha de São Miguel, Açores

4.1. Introdução

Em Portugal Continental a presença de agentes transmitidos por ixodídeos em bovinos é conhecida, sendo responsável por diversas perdas económicas, no entanto, não se conhecem prevalências exatas. Em estudo Silva *et al.* (2010) refere uma prevalência de 74,7% em bovinos, para hemoparasitas, enquanto um estudo de Gomes *et al.* (2013) refere uma prevalência de 36,8%. A theileriose mediterrânica e a anaplasmose bovina são doenças consideradas endémicas em determinadas regiões de Portugal, tendo já sido publicados casos fatais causados por estas afeções (Branco *et al.*, 2010; Gomes *et al.*, 2013; Stilwell, 2013). No arquipélago dos Açores são desconhecidos os agentes transmitidos por carraças que afetam bovinos, bem como as suas prevalências e prejuízos associados. O conhecimento epidemiológico da presença destes agentes é de extrema importância, para contrariar os prejuízos causados e delinear planos profiláticos adequados.

Além do desconhecimento epidemiológico no arquipélago dos Açores, no mês de julho de 2019 foram feitos esfregaços sanguíneos, pelos médicos veterinários da AASM-CUA, a partir de uma amostra recolhida a um vitelo no viteleiro da Cooperativa União Agrícola, C.R.L.. O animal, apesar de assintomático, estava infestado com carraças. Os esfregaços e os ixodídeos foram recolhidos e enviados para o Laboratório de Doenças Parasitárias da Faculdade de Medicina Veterinária – ULisboa; os resultados dos esfregaços efetuados foram positivos para *Theileria* sp., *Babesia* sp. e *Anaplasma marginale*, e as carraças classificadas como pertencentes ao género *Rhipicephalus* sp.. Existia também a referência a um possível surto de babesiose em 2015 por parte dos médicos veterinários da AASM-CUA.

Ambos os casos surgiram como impulsionadores para uma pesquisa mais aprofundada, de modo a conhecer quais os agentes transmitidos por carraças presentes na ilha de São Miguel, Açores. Uma vez que existem vetores biológicos capazes de transmitir os agentes anteriormente referidos e há a referência a um animal com historial de infeção, existiram motivos suficientes para o interesse na pesquisa de agentes transmitidos por ixodídeos em bovinos.

Como objetivos do presente estudo assumem-se: i) a pesquisa de agentes transmitidos por carraças em bovinos assintomáticos de 10 explorações da ilha de São Miguel, Açores; ii) a identificação dos agentes presentes; iii) o conhecimento da distribuição geográfica dos agentes.

4.2. Material e Métodos:

4.2.1. Explorações:

O presente estudo envolveu 10 explorações pecuárias da ilha de São Miguel (Açores), localizadas de acordo com o mapa apresentado na Figura 43.

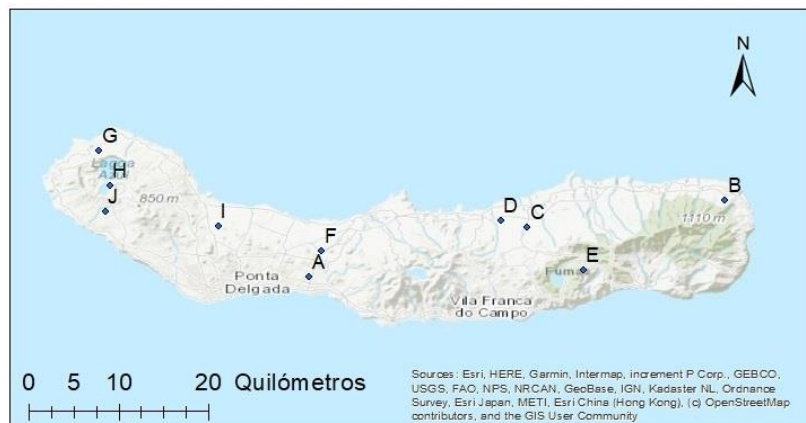


Figura 43: Mapa da ilha de São Miguel com a distribuição das explorações (letras de A - J) inseridas no estudo, efetuado com recurso ao programa informático ArcGIS Desktop 10.6®.

As explorações foram escolhidas com base num critério: possibilidade de confinar os animais a qualquer hora do dia. A exploração **A** foi incluída uma vez que se trata da exploração onde surgiu o vitelo positivo para diversos agentes (viteiro da Cooperativa União Agrícola, C.R.L.) e, a exploração **F** por ser a exploração onde se suspeitou de um surto de babesiose.

Todas as amostras foram recolhidas entre os dias 28 e 30 de outubro de 2019, uma vez que o intervalo de tempo era reduzido e que, além da recolha das amostras, existiam urgências do serviço clínico para resolver, e era necessário equipamento de contenção para animais teve de ser optar por este critério de escolha. A maioria das explorações dos Açores são de pequena dimensão, e os animais encontram-se em pastoreio durante todo o dia, apenas sendo possível recolher amostras aquando da ordenha.

4.2.2. Amostragem

Em cada exploração foram selecionados, aleatoriamente, 10 ou 11 animais para recolha de uma amostra de sangue e realização de esfregaços. Foram realizados três esfregaços sanguíneos e recolhidos 5 mL de sangue em tubo de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), por animal. O sangue foi recolhido da veia coccígea mediana utilizando uma seringa de 5 mL com uma agulha de 18G. O esfregaço sanguíneo foi efetuado pela técnica de arrastamento como é demonstrado na Figura 44.

Estes procedimentos foram realizados pela autora.

Todas as amostras recolhidas foram devidamente identificadas com uma letra, de **A – J**, e um número, de 1 – 11; a letra corresponde à exploração de origem e o número ao animal.

Foram recolhidas amostras a um total de 103 animais (Tabela 27).

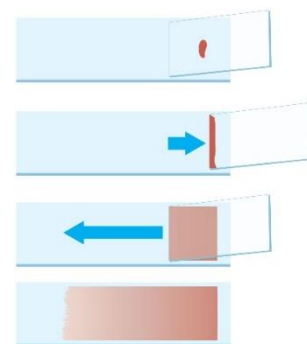


Figura 44: Esfregaço sanguíneo por arrastamento (Adaptado de <https://kasvi.com.br/esfrega-co-de-sangue-hematologia/>).

Tabela 27: Número de amostras recolhidas por exploração.

| Exploração | Número de animais | Exploração | Número de animais | Exploração | Número de animais |
|------------|-------------------|------------|-------------------|--------------|-------------------|
| A | 10 | E | 10 | I | 10 |
| B | 10 | F | 10 | J | 11 |
| C | 10 | G | 10 | | |
| D | 11 | H | 11 | Total | 103 |

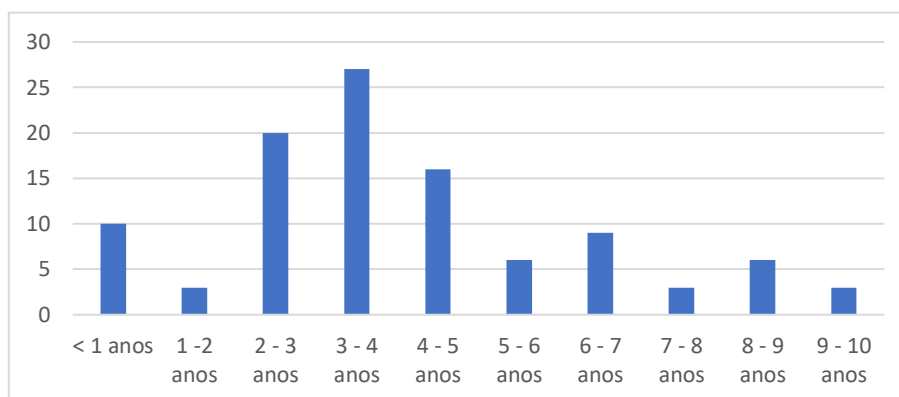


Gráfico 5: Número de animais por classe etária (em anos)

Com exceção da exploração **A** (vitelos de aptidão cárnea) todos os animais eram de aptidão leiteira. Nas diferentes explorações, a média de idades dos animais que fizeram parte da amostragem variou (Tabela 28), sendo maior o número dos que tinham entre três a quatro anos (Gráfico 5).

Tabela 28: Média de idades, em anos, por exploração.

| Exploração | A | B | C | D | E |
|---------------------------|-----------|----------|-----------|-----------|-----------|
| Idade média (anos) | 0.69±0.07 | 3.83±1.6 | 6.27±2.38 | 3.45±1.2 | 4.24±1.83 |
| Exploração | F | G | H | I | J |
| Idade média (anos) | 3.71±1.11 | 4.42±2 | 4.61±1.9 | 6.52±1.64 | 3.23±1.17 |

4.2.3. Inquérito epidemiológico

A cada proprietário das 10 explorações fez-se um inquérito, disponível no Anexo I, para obter informação sobre:

- Sistema de produção;
- Local de origem dos animais;
- Protocolos de desparasitação;
- Visualização de carraças;
- Presença de outros animais coabitantes na exploração;
- Hábitos de administração de fármacos;

- Presença de doenças que sejam diagnósticos diferenciais de doenças provocadas por agentes transmitidos por carraças.

O inquérito aos proprietários e o seu registo (utilizando a aplicação Memento Database[®]) foram sempre efetuados pela mesma pessoa (pela autora), de forma a uniformizar a amostra.

4.2.4. Detecção molecular de organismos

As amostras recolhidas foram processadas em laboratório e o trabalho de deteção molecular foi executado pelo *Tropical Animal Health and Production Lab* do Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA), Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, continuando ainda a decorrer. Este processo foi acompanhado pela autora, e realizado pela Dr.^a Sara Zúquete.

Em primeiro lugar fez-se uma extração de ADN e, de seguida elaborou-se a técnica de PCR, de modo a avaliar a presença de amostras positivas para *Babesia* spp. e *Theileria* spp. ou *Anaplasma* spp. e *Ehrlichia* spp. Após a execução desta técnica os resultados obtidos foram observados a partir de eletroforese em gel. De seguida, para que fosse feita a sequenciação genómica das amostras positivas, de modo a especificar qual o agente presente em cada uma, foi feita a inclusão de *amplicons* em plasmídeos e uma posterior clonagem e purificação, sendo de seguida enviados para sequenciação.

Após a recolha das amostras de sangue, foram armazenadas em tubos de EDTA e congeladas. A extração de ADN foi feita a partir de 120 μ L de sangue de cada amostra utilizando o Kit DNeasy[®] Blood & Tissue, com pequenas alterações ao protocolo recomendado pelo fabricante¹.

A concentração de ADN foi medida utilizando um espectrofotómetro (Nanodrop[®]).

Após a extração de ADN, as amostras foram amplificadas por PCR, no caso da pesquisa de *Babesia* spp. e *Theileria* spp. na região hipervariável quatro do gene 18S ácido ribonucleico ribossómico (ARNr), utilizando um par de *primers* complementares às sequências que flanqueiam essa região e são conservados em todas as espécies pertencentes aos géneros *Babesia* e *Theileria*, (5' CAATCCTGACACAGGGAGGT 3') e (5' TGATCGTCTTCGATCCCCTA 3')² (Branco *et al.*, 2010). No caso da pesquisa de *Anaplasma* spp. e *Ehrlichia* spp. foram utilizados o par de primers (5' GGTACCYACAGAAGAAGTCC 3') e (5' TAGCACTCATCGTTTACAGC 3') do gene 16S ARNr³.

¹ Inicialmente foram pipetados 120 μ L de sangue e 30 μ L de proteinase K para um *ependorf* e de seguida 70 μ L de PBS, o tempo do banho-maria foi estendido para 20 minutos, as centrifugações foram alteradas para 1100 x g (após colocação na coluna de DNeasy Mini[®]) e para 8000 x g (após a colocação de 500 μ L de buffer AW1), e por fim foram apenas adicionados 50 μ L de buffer AE à membrana do centro da coluna.

² A mistura foi incubada num termociclador a 98°C por três minutos e em ciclos de 35 vezes: a 98°C, oito segundos; 67°C, 25 segundos; 72°C, 25 segundos.

³ A mistura foi incubada num termociclador a 94°C por 10 minutos e em ciclos de 30 vezes: a 94°C, um minuto; 53°C, 30 segundos; 72°C, 30 segundos.

As amostras foram associadas inicialmente em *pools*. Foi feito um *pool* de cada exploração (denominado de “Total”) e dois *pools* incluindo duas explorações, uma utilizando as amostras pares de ambas as explorações (denominada de “Pares”), com os animais 2, 4, 6, 8 e 10 de cada exploração, e outra com as amostras ímpares de ambas as explorações (denominada de “Ímpares”), com os animais 1, 3, 5, 7 e 9 de cada exploração, como se pode observar na Figura 45.

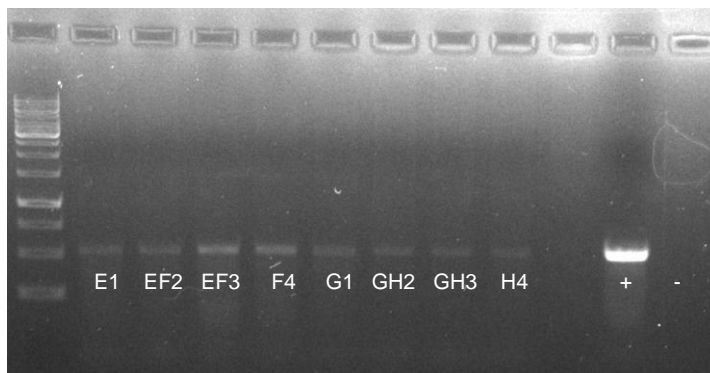


Figura 45: Eletroforese *pools* para pesquisa de *Babesia spp.* e *Theileria spp.*. E1: Todas as amostras da exploração E; EF2: Todas as amostras par (2, 4, 6, 8 e 10) das explorações E e F; EF3: Todas as amostras ímpar (1, 3, 5, 7, 9) das explorações E e F; F4: Todas as amostras das explorações F; G1: Todas as amostras da exploração G; GH2: Todas as amostras par (2, 4, 6, 8 e 10) das explorações G e H; GH3: Todas as amostras ímpar (1, 3, 5, 7, 9) das explorações G e H; H4: Todas as amostras das explorações H. +: Controlo positivo; -: Controlo negativo.

A formação de *pools* foi feita de modo a excluir explorações negativas, para que nessas explorações não fosse necessário efetuar análises moleculares individuais a cada uma das amostras, de forma a rentabilizar tempo e a poupar material (Figura 46).

De seguida foram efetuadas análises individuais às amostras pertencentes a *pools* positivos. Os resultados disponíveis encontram-se no Anexo II.

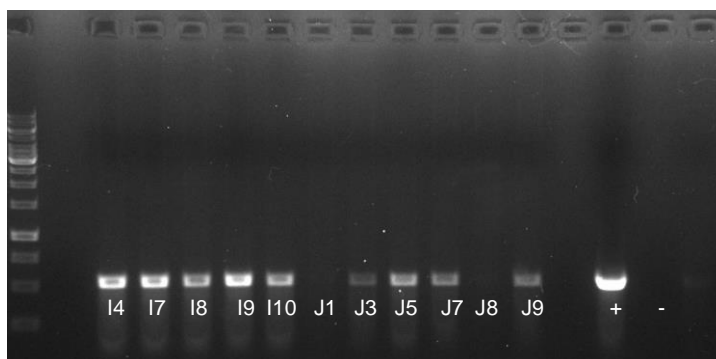


Figura 46: Eletroforese amostras individuais para pesquisa de *Babesia spp.* e *Theileria spp.* animais 4, 7, 8, 9 e 10 da exploração I e animais 1, 3, 5, 7, 8 e 9 da exploração J. +: Controlo positivo; -: Controlo negativo.

Os produtos de PCR foram detetados por eletroferese em gel de agarose, com Green Safe[®]⁴, para detetar bandas especificamente amplificadas. De seguida, os géis foram analisados e fotografados sob trans-iluminação UV (ChemiDoc™ XRS+ System with Image Lab™ Software[®]).

Os *amplicons* (obtidos a partir de PCR) foram ligados a um vetor Pjet1.2/blunt[®]⁵ para clonagem em *Escherichia coli*, estirpe DH5 α . O plasmídeo Pjet1.2/blunt[®] possui um gene de resistência a ampicilina. Este processo foi feito utilizando o kit CloneJET PCR Cloning[®], com base nas recomendações do fabricante.

As colónias foram todas propagadas em placas de Petri com LB Agar. As colónias positivas por PCR foram selecionadas para crescer em meio LB líquido⁶.

A purificação de plasmídeos em bactérias foi efetuada através da utilização do kit Canvax[®].

Posteriormente, foi feita a quantificação de ADN, sendo que foram enviados para sequenciação 100 a 400 μ L, consoante a concentração de ADN de cada amostra.

As amostras obtidas a partir da purificação do plasmídeo foram enviadas para sequenciação para o Serviço *Eurofins Genomics*.

4.2.5. Detecção microscópica de organismos

Para pesquisa microscópica dos organismos, executaram-se esfregaços de sangue que foram corados pelo método de *Giemsa*, utilizado-se corante *Giemsa Stain, Modified Solution[®] - Sigma*. Esta técnica foi executada no Laboratório de Parasitologia Vitor Caeiro do Instituto Mediterrâneo para a Agricultura, Ambiente e Desenvolvimento, Universidade de Évora. Tendo sido realizada pela autora sob a supervisão da Prof.^a Ludovina Padre.

O protocolo de coloração dos esfregaços:

1. Preparação do corante:
 - a. Diluição em água destilada: 24 gotas de corante para cada 10 mL de água destilada.
2. Coloração das lâminas:
 - a. Colocar algumas gotas de metanol de modo a cobrir o esfregaço;
 - b. Esperar 5 minutos;
 - c. Retirar o excesso de metanol e secar ligeiramente;
 - d. Colocar algumas gotas de corante diluído cobrindo o esfregaço;
 - e. Esperar 25 minutos;
 - f. Lavar com água destilada;
 - g. Deixar secar ao ar.

⁴ Na concentração de 10 μ L/L.

⁵ Para que ocorra a inclusão do plasmídeo nas bactérias, foram submetidos a um choque térmico de 42°C.

⁶ A 37 °C durante 16 horas.

Após secos, os esfregaços foram observados ao microscópio ótico com uma ampliação de 1000x, utilizando óleo de imersão.

A visualização das lâminas coradas ocorreu após conhecido o resultado de detecção molecular, de modo a verificar a presença de formas parasitárias nos esfregaços positivos.

As fotografias foram efetuadas utilizando um microscópio Olympus CX43[®], com a câmara Olympus Soft Imaging Solutions GMBH, Model Olympus LC30[®] recorrendo ao programa informático LCmicro[®].

4.3. Resultados

4.3.1. Inquérito epidemiológico

Foram questionadas 10 explorações perfazendo uma totalidade de 3151 animais. Nove das explorações (**B, C, D, E, F, G, H, I e J**) apresentavam uma produção predominantemente em pastoreio. Todas as explorações, à exceção da exploração **A**, possuíam animais de reposição própria, sendo que as explorações **B, D, F e G** compravam alguns animais a outras explorações. Como se pode observar na Tabela 30 os protocolos de desparasitação das diversas explorações são variáveis, sendo o mais comum a utilização de febendazol (Panacur[®]) em vitelos; de ivermectina e clorsulon (Ivomec F[®]) no momento da secagem; e de eprinomectina (Eprinex[®] Pour-On) no verão. Apenas na exploração **A** foi referida a visualização rara de carraças, sendo que as restantes explorações referem nunca encontrar carraças. Todas as explorações, à exceção da exploração **B**, referem a presença de outros animais em contacto com os bovinos. Em todas as explorações, ocorre a administração de fármacos é feita pelos proprietários, ou tratadores dos animais, sendo que os hábitos de troca de agulha nem sempre são frequentes, as explorações **A, D e H** utilizavam a mesma agulha até estar romba. A maioria das explorações refere já ter tido animais com hemoglobinúria (**B, E, F, G, H e J**). Por fim, apenas a exploração **F** referiu já ter tido animais com leptospirose. Os resultados do inquérito epidemiológico efetuado aos produtores encontram-se nas Tabela 29, Tabela 30 e Tabela 31.

Tabela 29: Caracterização da exploração quanto ao efetivo, modo de produção e origem dos animais.

| Exploração | Número total de animais | Modo de produção | Origem dos animais |
|------------|-------------------------|------------------|--|
| A | 900 | Estabulação | Diversas explorações |
| B | 235 | Pastagem | Fêmeas de reposição provenientes da exploração Machos comprados a outras explorações Recorrem a inseminação artificial |
| C | 123 | Pastagem | Provenientes da própria exploração |
| D | 170 | Pastagem | Provenientes da própria exploração (compra animais esporadicamente) |
| E | 85 | Pastagem | Provenientes da própria exploração |
| F | 88 | Pastagem | Provenientes da própria exploração e compra alguns animais a outras explorações |
| G | 430 | Pastagem | Provenientes da própria exploração e compra alguns animais a outras explorações |

| | | | |
|----------|-----|----------|------------------------------------|
| H | 520 | Pastagem | Provenientes da própria exploração |
| I | 150 | Pastagem | Provenientes da própria exploração |
| J | 450 | Pastagem | Provenientes da própria exploração |

Tabela 30: Protocolo de desparasitação por exploração e visualização de carraças.

| Exploração | Protocolo de desparasitação | | Frequência de visualização de carraças |
|------------|-------------------------------------|---|--|
| | Momento | Fármaco | |
| A | Idade: 1.5 meses | Febendazol (Panacur [®]) | Rara |
| | Idade 3 – 3.5 meses | Ivermectina e clorsulon (Ivomec F [®]) | |
| | Idade: 10 meses | | |
| B | Animais jovens | Ivermectina e clorsulon (Ivomec F [®]) ou albendazol (Albendavet [®]) | Nula |
| C | Vitelos; Idade: 1 ano; Secagem | Ivermectina e clorsulon (Ivomec F [®]) | Nula |
| | Vitelos | Febendazol (Panacur [®]) | |
| | Verão | Eprinomectina (Eprinex [®] Pour-On) | |
| D | Vitelos | Febendazol (Panacur [®]) | Nula |
| | Secagem | Ivermectina e clorsulon (Ivomec F [®]) | |
| | Verão | Eprinomectina (Eprinex [®] Pour-On) | |
| E | Verão | Eprinomectina (Eprinex [®] Pour-On) | Nula |
| F | Vitelos | Febendazol (Panacur [®]) e toltrazuril (Baycox [®]) | Nula |
| | Verão | Eprinomectina (Eprinex [®] Pour-On) | |
| G | Secagem | Ivermectina e clorsulon (Ivomec F [®]) | Nula |
| | Verão | Eprinomectina (Eprinex [®] Pour-On) | |
| H | Verão (não efetuado no ano de 2019) | Eprinomectina (Eprinex [®] Pour-On) | Nula |
| I | Algumas vacas | Ivermectina e clorsulon (Ivomec F [®]) | Nula |
| | Verão | Eprinomectina (Eprinex [®] Pour-On) | |
| J | Vitelos | Febendazol (Panacur [®]) | Nula |
| | Secagem | Ivermectina e clorsulon (Ivomec F [®]) | |
| | Verão | Eprinomectina (Eprinex [®] Pour-On) | |

Tabela 31: Resultados sobre a presença de outros animais em contacto com bovinos, administração de fármacos pelo proprietário, bem como o número de vezes que utilizavam a mesma agulha, sobre a presença de animais com hemoglobinúria e sobre a presença de animais diagnosticados com leptospirose no efetivo.

| Exploração | Outros animais | Administração de fármacos | Utilização da mesma agulha | Hemoglobinúria | Leptospirose |
|------------|----------------|---------------------------|----------------------------|----------------|--------------|
| A | Sim | Sim | Até estar romba | Não | Sem dados |
| B | Não | Sim | Troca de agulha sempre | Sim | Não |
| C | Sim | Sim | Troca de agulha sempre | Não | Não |
| D | Sim | Sim | Até estar romba | Não | Não |

| | | | | | |
|----------|-----|-----|------------------------------------|-----|-----------|
| E | Sim | Sim | Troca frequentemente | Sim | Não |
| F | Sim | Sim | Troca frequentemente | Sim | Sim |
| G | Sim | Sim | Utiliza a mesma agulha 30-40 vezes | Sim | Não |
| H | Sim | Sim | Até estar romba | Sim | Não |
| I | Sim | Sim | Troca frequentemente | Não | Sem dados |
| J | Sim | Sim | Uma agulha por frasco | Sim | Não |

4.3.2. Pesquisa Molecular

Após a leitura das provas de eletroferese pode-se observar que 90% das explorações (**B, C, D, E, F, G, H, I e J**) apresentaram resultados positivos para a pesquisa de *Theileria* spp. e *Babesia* spp. e que 20% das explorações (**F e I**) apresentaram resultados positivos para a pesquisa de *Anaplasma* spp. e *Ehrlichia* spp. Na Tabela 32 estão apresentados os resultados das eletrofereses dos pools.

Tabela 32: Resultados do PCR dos pools para pesquisa de *Babesia* spp. e *Theileria* spp e *Anaplasma* spp. e *Ehrlichia* spp. Total – amostras 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10 de cada exploração; Pares – amostras 2,4,6,8,10 de duas explorações; Ímpares – amostras 1,3,5,7,9 de duas explorações; Vermelho e “-” – Resultado negativo; Verde e “+” – Resultado positivo

| Agentes | Análise | Exploração | | | | | | | | | |
|-------------------------|---------|------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | A | B | C | D | E | F | G | H | I | J |
| <i>Babesia</i> spp. | Total | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | Pares | + | | + | | + | | + | | + | |
| <i>Theileria</i> spp. | Ímpares | + | | + | | + | | + | | + | |
| <i>Anaplasma</i> spp. e | Total | - | - | - | - | - | + | - | - | + | - |
| | Pares | - | | - | | - | | - | | + | |
| <i>Ehrlichia</i> spp. | Ímpares | - | | - | | + | | - | | + | |

4.3.3. Sequenciação Genômica

Após a leitura da eletroferese de amostras individuais (Anexo II), foram enviadas para sequenciação genômica para o Serviços *Eurofins Genomics* algumas amostras (trabalho ainda a ser desenvolvido).

Segundo o resultado dos Serviços *Eurofins Genomics* as amostras **C1** e **I8** correspondem a amostras de *Theileria orientalis*, genótipos *Chitose* e *Buffeli*, respetivamente; e a amostra **F1** a *Anaplasma bovis*.

A sequenciação genómica obtida para cada uma das amostras foi:

>**C1_B/T_Chitose_97AA35_pJET_Fw_13Mar20_Rv** complement (MH208633.1 100%, 99,43%) (4 nucleotides different and 1 deletion)

```
CAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACGGGGCTTAATGTCTTGT
AATTGGAATGATGGGAATTTAAACCTCTTCCAGAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGC
CAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAATTGTTGCAGTTAAAAAGCT
CGTAGTTGAATTTCTGCTGCATTTCAATTTCTTTCTGAGTTTGTGTTTTGCGGCTTATTTCCG
TTTGATTTTTTTCTTTCCGGATGATTACTTTGAGAAAATTAGAGTGCTCAAAGCAGGCTTTTGC
CTTGAATAGTTTAGCATGGAATAATAAAGTAGGACTTTGGTTCTATTTTGTGGTTTTAGGTA
CAAAGTAATGGTTAATAGGAACAGTTGGGGGCATTCGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAAT
TCTTAGATTTGTTAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTGCGCAAGGATGTTTTCATTAATCA
AGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCA
```

>**I8_B/T_Buffeli_97AA37 + 97AA38_Both** senses confirmed!(MH208641.1 100%, 100%)_13Mar20

```
CAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACGGGGCTTAATGTCTTGT
AATTGGAATGATGGGAATTTAAACCTCTTCCAGAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGC
CAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAATTGTTGCAGTTAAAAAGCT
CGTAGTTGAATTTCTGCTGCATTACATATCTCTTGTGTTGAGTTTGTGTTTTGTGGCTTATTTCC
GTTTGATTTTTTTCTTTCCGGATGATTACTTTGAGAAAATTAGAGTGCTCAAAGCAGGCTTTT
GCCTTGAATAGTTTAGCATGGAATAATAAAGTAGGACTTTGGTTCTATTTTGTGGTTTTAG
GTACCAAAGTAATGGTTAATAGGAACAGTTGGGGGCATTCGTATTTAACTGTCAGAGGTGA
AATTCTTAGATTTGTTAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTGCGCAAGGATGTTTTCATTAAT
CAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCA
```

>**F1_97AA31 +97AA32_Fw+Rv_6Mar20_confirmed_100%** ident with MK028574.1
Anaplasma bovis

```
GGTACCCACAGAAGAAGTCCCGGCAAACCTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAG
GGGGCAAGCGTTGTTCCGAATTATTGGGCGTAAAGGGCATGTAGGTGGTTTTGGTAAGTTA
AAGGTGAAATGCCAGGGCTTAACCCTGGAGCTGCTTTTAATACTGCCAGACTGGAGTCCG
GGAGAGGATAGCGGAATTCCTAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTAGGAGGAACACC
AGTGGCGAAGGCGGCTATCTGGTCCGGTACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGC
AAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGAGTGCTA
```

4.3.4. Observação microscópica

Após a observação ao microscópio dos esfregaços sanguíneos, foram encontradas formas intraeritrócitárias compatíveis com *Theileria orientalis*, Figura 47, e formas intramonocitárias compatíveis com *Anaplasma bovis*, Figura 48.

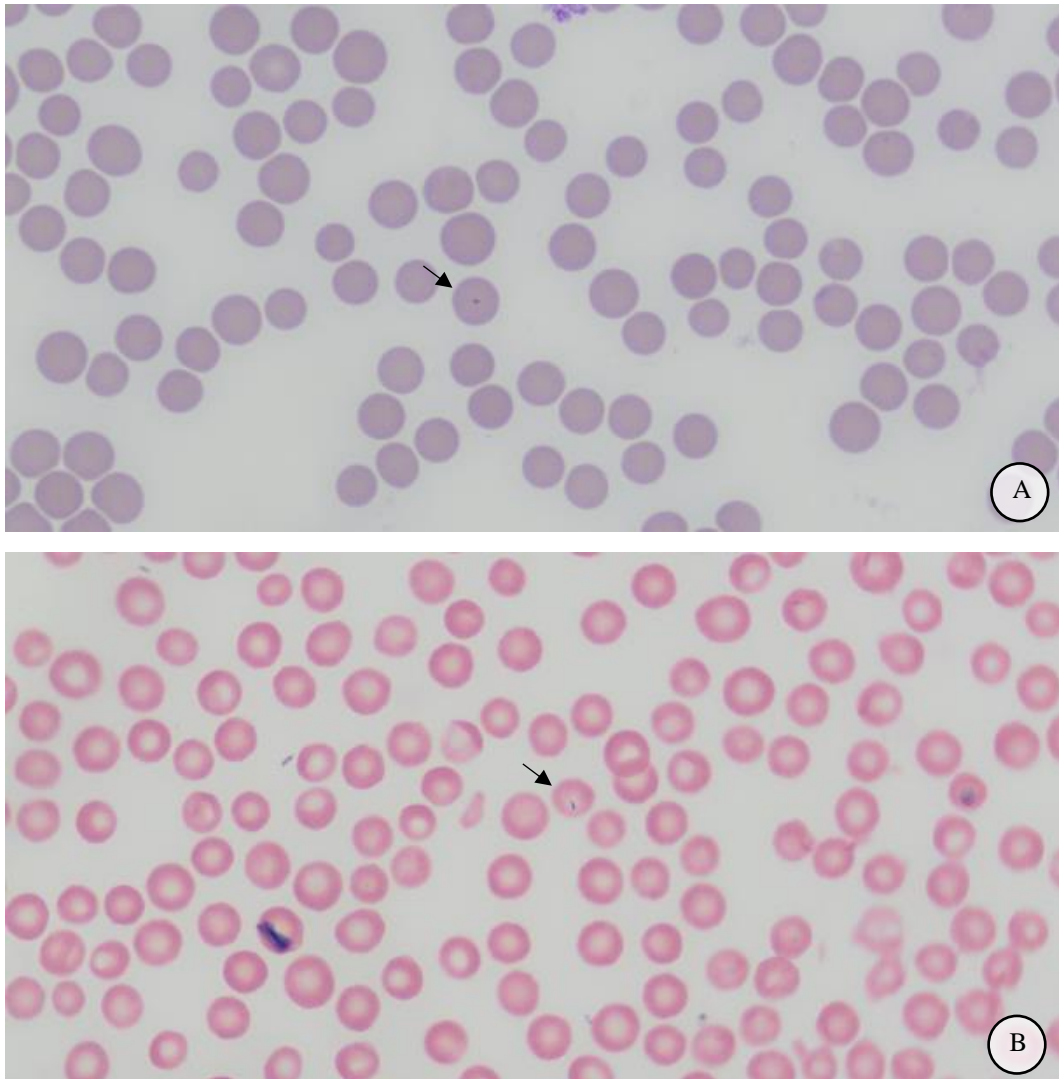


Figura 47: Formas intraeritrócitárias (seta preta) compatíveis com *Theileria orientalis*, amostra: A - E5; B - F7 (esfregaços corados com o método de Giemsa, ampliação de 1000 x).

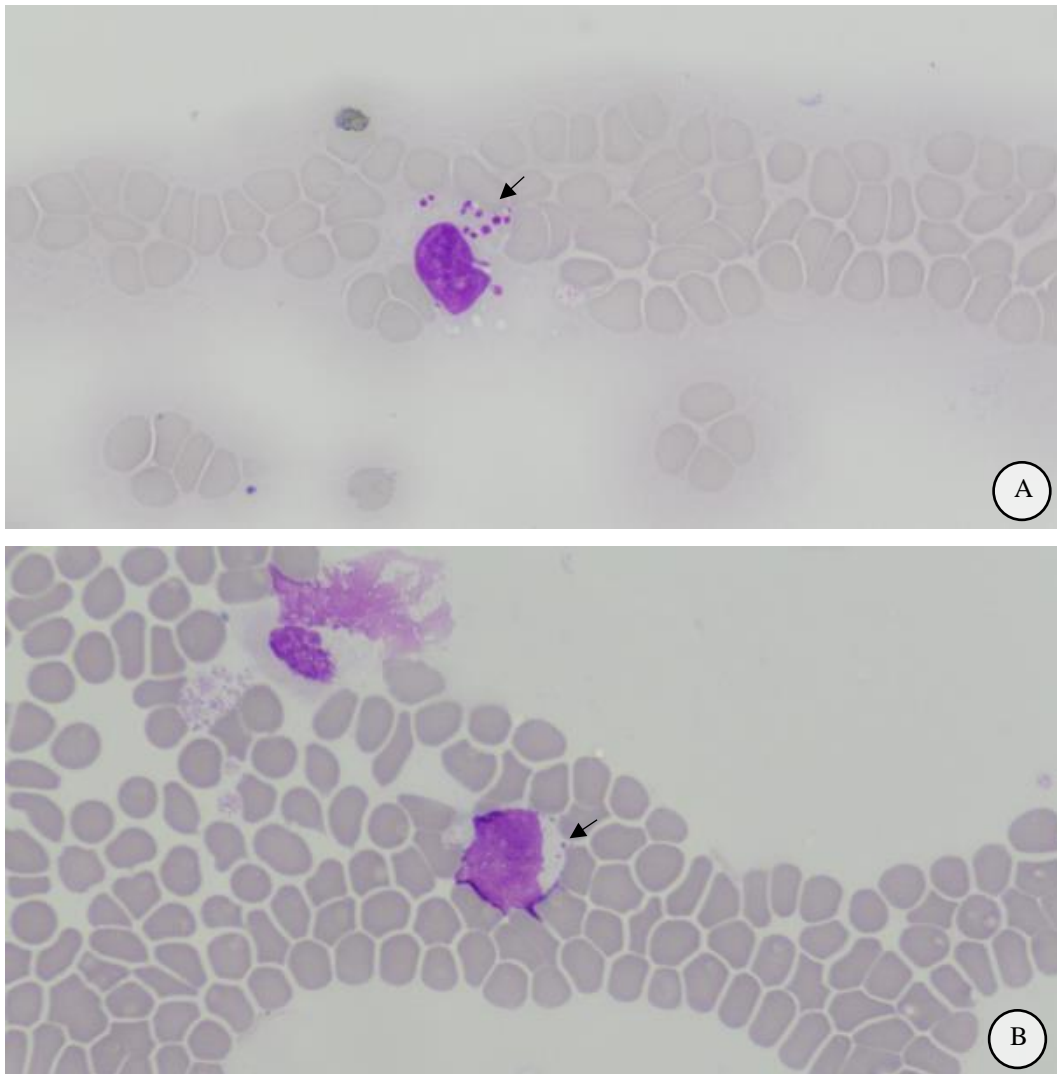


Figura 48: Forma intramonocitária (seta preta) compatível com *Anaplasma bovis*, amostra F1 (esfregaços corados com o método de Giemsa, ampliação de 1000 x).

4.4. Discussão

Durante o estágio curricular na AASM-CUA foram efetuadas diversas visitas ao viteleiro da CUA, local onde surgiu o vitelo assintomático infetado com *Babesia* sp., *Theileria* sp. e *Anaplasma marginale*, em julho de 2019, referido na introdução, de onde partiu o interesse em conhecer o estado de infeção da ilha, referente a agentes transmitidos por ixodídeos, até então desconhecido.

O objetivo da recolha de amostras era atingir uma vasta área geográfica da ilha de São Miguel, tendo sido recolhidas 10 amostras por exploração. Deste modo, em média atingiu-se 5,67% da população de cada exploração, variando entre 11,76% (exploração F) e 1,11% (exploração A); as explorações inquiridas eram explorações de dimensões elevadas comparativamente à maioria das explorações existentes na ilha de São Miguel.

Segundo a Listagem dos Organismos Terrestres e Marinhos dos Açores, de 2010, estão reportadas as seguintes espécies de ixodídeos: *Haemaphysalis punctata*, *Rhipicephalus annulatus*, *Rhipicephalus bursa*, *Rhipicephalus sanguineus* e *Ixodes hexagonus*, em São Miguel, e *Dermacentor marginatus*, *Hyalomma lusitanicum*, *Hyalomma marginatum marginatum*, *Rhipicephalus turanicus* e *Ixodes ricinus* noutras ilhas do arquipélago.

Não são conhecidas as consequências de uma população mais abundante de carraças em termos de possibilidades acrescidas de circulação de agentes patogénicos transmitidos pelas mesmas, dentro e entre regiões geográficas (Grandi *et al.*, 2018). A adaptação às mudanças climáticas e a novos habitats podem influenciar a sua ocorrência e a transmissão de agentes patogénicos, como hemoparasitas (Raboloko *et al.*, 2020). Deste modo, a existência de poucas espécies de ixodídeos na ilha de São Miguel, não implica uma baixa circulação de agentes patogénicos transmitidos.

As pesquisas de agentes foram efetuadas a partir de técnicas moleculares, nomeadamente PCR, uma vez que se trata da técnica mais eficiente para pesquisa de agentes em animais portadores (Almeria *et al.*, 2001).

Após a observação dos resultados obtidos a partir da análise dos *pools* efetuados (Tabela 32), conclui-se que nove em 10 das explorações (**B, C, D, E, F, G, H, I e J**) são positivas para a pesquisa de *Babesia* spp. e *Theileria* spp., e duas em 10 das explorações (**F e I**) são positivas para a pesquisa de *Anaplasma* spp. e *Ehrlichia* spp..

No caso de *Babesia* spp. e *Theileria* spp., nas pesquisas dos *pools*, as explorações **A e B** obtiveram um resultado negativo nas pesquisas do *pool* "**Total**", mas positivo nas pesquisas nos *pools* **ABpares** e **ABímpares**, o que indica a presença de algumas amostras individuais positivas. Nas pesquisas individuais, a amostra **B8** é positiva, o que justifica a banda no *pool* **ABpares**. Ainda não está justificada a banda no *pool* **ABímpares** pelas amostras individuais até agora realizadas, faltando a análise das amostras **A8, A9, B1 e B2**. Sabendo que existia pelo menos um positivo, a pesquisa no *pool* **BTtotal** foi repetida, mas o resultado foi negativo novamente, o que se pode justificar pela presença de algum inibidor da reação de PCR, ou pela maior quantidade de ADN presente na amostra (3,5 μ L), que dificulte o emparelhamento dos *primers*. Deste modo, o *pool* **B** deverá ser repetido com uma enzima mais eficiente, como por exemplo *Phusion*.

Este é o primeiro registo da presença de *Theileria orientalis* na ilha de São Miguel e no Arquipélago dos Açores, no nosso conhecimento. Tradicionalmente a theileriose causada pelo complexo *Theileria orientalis* é benigna e assintomática, no entanto, já foram publicados casos clínicos na Austrália, Nova Zelândia, Japão, Coreia, China e Vietname; tendo sido registados inúmeros surtos tanto em bovinos de aptidão leiteira como de aptidão creatopoiética relacionados com situações de *stress*, ou imunodepressão (Gebrekidan *et al.*, 2019; Yam *et al.*, 2019). A espécie *Theileria orientalis* começou por ter especial importância na região Ásia-Pacífico, tendo sido reportada também no Estados Unidos da América. Atualmente parece ter uma distribuição cosmopolita, já tendo sido registada em mais de 40 países, no entanto, não existe clareza sobre

a distribuição dos genótipos e da sua patogenicidade (Gebrekidan *et al.*, 2019). Em Portugal continental é referido por Gomes *et al.* (2013) uma prevalência de *Theileria orientalis* de 10,1%, enquanto Silva *et al.* (2010) refere uma prevalência de 69,9%, em estudos referentes a amostras recolhidas em 2008 e 2006, a 1407 e 1104 animais, respetivamente. O estudo de Silva *et al.* (2010) recolhe amostras apenas dos distritos de Santarém, Setúbal, Évora e Beja.

Como resultado deste trabalho, a espécie *Anaplasma bovis*, no nosso conhecimento, é registada pela primeira vez em Portugal. A infeção por esta *Rickettsia* tem sido documentada como assintomática, no entanto, já foram publicados diversos casos de patogenicidade associados ao agente (Belkahia *et al.*, 2015). A infeção por *Anaplasma bovis* é conhecida por “anaplasmosse monocítica” (Priyanka *et al.*, 2017). O agente *Anaplasma bovis* foi detetado na Brasil, China, Irão, Japão, e África, tendo já sido encontrada noutros territórios (Doan *et al.*, 2013). Silaghi *et al.* (2017) refere uma distribuição geográfica cosmopolita, excluindo apenas a Austrália; a primeira referência na Europa foi feita na Sicília, tendo de seguida sido referido em Itália continental, em Espanha e na Croácia (Georges *et al.*, 2001; Ceci *et al.*, 2014; Palomar *et al.*, 2015; Jurković *et al.*, 2020).

O inquérito epidemiológico efetuado previamente aos produtores permite conhecer a presença de alguns fatores que possam estar relacionados com a presença, ou não, dos agentes. Em relação à presença de outros animais em contacto com os bovinos, destaca-se a presença de cães e gatos, sendo importante referir a elevada prevalência de ratos na ilha. Além de bovinos, o agente *Theileria orientalis* já foi isolado de animais como cavalos, ovelhas, gatos, cães, porcos, pequenos roedores e cangurus e o agente *Anaplasma bovis* em ruminantes domésticos e selvagens, cavalos, veados, cães, gatos, roedores e lagomorfos, pelo que as diferentes espécies que afetam podem servir de reservatório para infetar bovinos (Harrus *et al.*, 2011; Watts *et al.*, 2016; Oliveira *et al.*, 2018; Seo *et al.*, 2019). É sabido que pequenos ruminantes e animais selvagens são hospedeiros de diversas espécies de carraças que infestam bovinos (Raboloko *et al.*, 2020), e que a interação de animais domésticos (principalmente bovinos, cães, galinhas e gatos), aves migratórias e animais selvagens possui o potencial de facilitar a disseminação de agentes patogénicos (Omondi *et al.*, 2017). Ou seja, uma vez que os agentes encontrados podem infetar outras espécies animais existentes na ilha de São Miguel, o contacto direto entre animais pode levar a que ocorram infestações de bovinos por carraças infetadas.

Todos os animais a que foram recolhidas amostras apresentavam-se saudáveis, sem qualquer sinal clínico evidente. Foi questionado aos produtores se durante a sua experiência já tinham observado animais com hemoglobínúria, como sinais de babesiose e theileriose, bem como, se na sua exploração já tinham tido animais diagnosticados com leptospirose, uma vez que a leptospirose é um dos diagnósticos diferenciais de babesiose e theileriose, sendo comum na ilha de São Miguel. Os produtores que referiram ter, ou já ter tido animais com hemoglobínúria, referem que a causa era hematúria enzoótica bovina, devido à ingestão do feto *Pteridium aquilinum*, dados registados na Tabela 31.

As principais perdas económicas devido a theileriose oriental estão relacionadas com aborto, diminuição significativa na produção de leite (qualitativa e quantitativamente) em bovinos leiteiros, e morbidade e mortalidade severa (Gebrekidan *et al.*, 2019). O aborto é um dos principais sinais clínicos facilmente relatados por produtores, levando a elevadas perdas económicas. Ao longo do estágio curricular não foram acompanhadas explorações com esse problema, uma vez que se trata de um problema reprodutivo e está dependente dos médicos veterinários responsáveis por essa área. No entanto, existem diversas explorações com problemas reprodutivos associados a aborto. Uma vez que são conhecidos problemas associados a IBR, BVD, leptospirose, entre outros agentes, na ilha de São Miguel, estes são os principais agentes associados a aborto, contudo, poderá existir um subdiagnóstico de perdas associadas à presença de *Theileria orientalis*.

São conhecidos diversos génotipos de *Theileria orientalis*, sendo que apenas os génotipos *Ikeda* e *Chitose* são conhecidos como patogénicos, causadores de mortalidade e morbidade considerável, podendo ocorrer de forma isolada ou em co-infeções (Jenkins *et al.*, 2015; Gebrekidan *et al.*, 2019). Por outro lado, o génotipo *Buffeli* é associado a uma theileriose benigna (Jenkins *et al.*, 2015). Na ilha de São Miguel foram encontrados os génotipos *Chitose* e *Buffeli*.

Animais que foram expostos ao agente *Theileria orientalis* apresentam parasitemias mais baixas e recuperam das infeções mais rapidamente e com uma menor morbidade. No entanto, os hemoparasitas podem persistir no hospedeiro, podendo ocorrer a sua proliferação em situações de *stress* (Yam *et al.*, 2019). Segundo Hammer *et al.*, (2016) a infeção assintomática por theileriose oriental permanece durante 5 meses.

As infeções por *Anaplasma bovis* são raras e podem apresentar-se como subclínicas, no entanto, podem observar-se os seguintes sinais clínicos: mucosas pálidas (devido a anemia), leucopenia, trombocitopenia, hipertermia, perda anormal de peso, fraqueza, mucosas pálidas, inflamação do linfonodo pré-escapular e até morte (Fukui & Inokuma, 2019; Guo *et al.*, 2019b). Os sinais clínicos são mais comuns em animais jovens (Rymaszewska & Grenda, 2008). A infeção por *Anaplasma bovis* em bovinos foi documentada como assintomática, mas também foi associada à morte, em poucas horas ou dias, após os primeiros sinais clínicos (Goethert & Telford, 2003).

Na Croácia foi descrito um caso onde três bovinos morreram repentinamente, tendo sido observado icterícia, esplenomegalia e urina escura na necrópsia. O diagnóstico foi efetuado através de PCR, reportando a co-infeção de *Anaplasma bovis* e *Theileria orientalis*, pelo que se considerou que a morte ocorreu devido a uma crise hemolítica provavelmente devido à sinergia entre os dois agentes (Jurković *et al.*, 2020). Observando os resultados primitivos da análise molecular individual das amostras **F1**, **I4** e **I7** existem infeções mistas por *Theileria orientalis* e *Anaplasma bovis* na ilha de São Miguel, pelo que casos semelhantes podem ocorrer.

Segundo Yam *et al.* (2019) o principal vetor transmissor de *Theileria orientalis* é *Haemaphysalis longicornis*, no entanto, em países onde o vetor existe em baixa prevalência ou que não seja conhecido, o agente pode ser transmitido por outras espécies do género

Haemaphysalis ou ainda por outros géneros de ixodídeos. O organismo *Anaplasma bovis* foi previamente relatado em algumas espécies e géneros de ixodídeos como *Rhipicephalus sanguineus* e *R. turanicus* em Israel, *Hyalomma spp.* no Irão, *Hyalomma spp.*, *R. appendiculatus* e *Amblyomma variegatum* em África, *Haemaphysalis megaspinosa*, *Ixodes persulcatus* e *Ixodes ovatus* no Japão e *H. longicornis* na Coreia (Harrus *et al.*, 2011). A transmissão de *Theileria orientalis* foi reportada em *Haemaphysalis punctata* no Reino Unido, na Hungria, em Portugal, na Grécia e no Irão, em *Rhipicephalus bursa* em Itália e em *R. annulatus* na Turquia (Yam *et al.*, 2019) e de *Anaplasma bovis* por *H. punctata* em Espanha, *R. sanguineus* no Bangladesh e em Israel (Harrus *et al.*, 2011; Palomar *et al.*, 2015; Qiu *et al.*, 2016). Assim, apesar de serem fortes as evidências da existência de ixodídeos com capacidade vetorial, para *Theileria orientalis* e *Anaplasma bovis* na ilha de São Miguel, seria importante a pesquisa destes agentes nos próprios ixodídeos, bem como em piolhos, uma vez que os produtores referem a sua presença frequente.

Através da observação de diferentes explorações ao longo do estágio curricular pode-se afirmar que existem muitas explorações na ilha de São Miguel que não realizam qualquer protocolo de desparasitação. Apesar da resposta à pergunta sobre a visualização de carraças nas vacas ser negativa, muitos dos produtores referem a visualização de piolhos frequentemente, podendo colocar-se a hipótese de se tratar de formas imaturas de ixodídeos. A ivermectina é altamente eficaz no tratamento de infeções por endoparasitas, sendo que também suprime o ingurgitamento, a muda e a reprodução de diversas carraças (Park *et al.*, 2019). Um estudo efetuado por Park *et al.*, (2019), refere que a ivermectina pode ser eficaz na prevenção da hemólise de hemácias causadas por hemoparasitas, afirmando o mesmo autor que a ivermectina se mostrou eficaz no controlo da infeção por *Theileria orientalis*. Em conclusão, a ivermectina pode prevenir doenças transmitidas por carraças e sintomas clínicos relacionados, reduzindo as desvantagens associadas à criação de bovinos em pastagens. Os métodos de controlo de carraças podem influenciar a prevalência e a estabilidade endémica destas doenças numa área (Raboloko *et al.*, 2020), podendo justificar assim a ausência de sinais clínicos compatíveis com doença.

Para efetivos leiteiros infetados cronicamente, em áreas endemicamente estáveis, o efeito da infeção por *Theileria orientalis* genótipo *Ikeda* na produção, provavelmente, será menos importante do que os efeitos de má nutrição ou de outra doença endémica, no entanto, está presente a possibilidade de poderem ocorrer surtos (Lawrence *et al.*, 2019).

A doença clínica por *Theileria orientalis*, apesar de já ter sido reportada em animais que se encontram confinados, está normalmente associada a animais em pastoreio, sobreposto a uma possível responsabilidade de hospedeiros de vida selvagem contaminarem pastagens com carraças infetadas (Watts *et al.*, 2016). Após a análise dos resultados do inquérito epidemiológico é importante referir que a exploração **A** corresponde ao viteleiro da CUA, onde se procede à engorda de vitelos de aptidão creatopoiética, essencialmente de raça cruzados de *Aberdeen-Angus*, proveniente de um elevado número de explorações da ilha de São Miguel. Deste modo,

consiste em animais em engorda, que se encontram sempre estabulados, e com uma densidade populacional elevada. As explorações **C**, **E** e **G** referem que os animais ficam estabulados durante parte do dia, enquanto se procede à ordenha; a exploração **F** refere que os animais se encontram estabulados aquando da escassez de alimento, ou devido a adversidades climatéricas, dados referidos na Tabela 29. Em resumo, em todas as explorações à exceção da exploração **A** todos os animais permanecem grande parte da sua vida em regime de pastoreio. O que pode concordar com a teoria de uma maior infeção em animais em pastoreio, o que faz mais sentido tendo em conta o ciclo de vida dos ixodídeos.

De acordo com Hammer *et al.*, (2016) é possível que fatores imunológicos do vetor e do hospedeiro resultem na troca de genótipo de *Theileria orientalis* e é provável que tenham um papel na persistência do parasita no hospedeiro mamífero e na sua transmissão a partir do vetor carraça. Deste modo, seria de esperar que a incapacidade do parasita se recombinar geneticamente reduzisse a diversidade geral dentro da sua população; pelo que a transmissão mecânica extensa do parasita diminuiria a sua capacidade de escapar ao sistema imunológico do hospedeiro. Portanto, segundo os mesmos autores, com a parasitose persistente no recetor, a transmissão mecânica pode ajudar a explicar a rápida disseminação do agente em grandes áreas geográficas, no entanto, é provável que as carraças, como vetores biológicos, sejam essenciais para manter a virulência e a patogenicidade do agente. Ainda segundo Hammer *et al.*, (2016), ocorre transmissão mecânica de *Theileria orientalis* através da transfusão de pequenas doses de sangue infetado, cerca de 0.1 mL, pelo que, o agente pode ser transmitido através de um reduzido número de piroplasmas, referindo o risco das práticas rotineiras de criação de animais, tais como: reutilização de agulhas, alicates de colocação de brincos, além de ferimentos em animais, práticas muito comuns e referidas pelos produtores (Tabela 31). A transmissão através insetos picadores/hematófagos (incluindo moscas, piolhos e mosquitos) é também referida por Hammer *et al.*, (2016). No inquérito epidemiológico efetuado os produtores referem a ausência de carraças nos animais, contudo, referem a presença de piolhos frequentemente. Estes autores referem a transmissão mecânica de *Theileria orientalis* através de piolhos sugadores, nomeadamente da espécie *Linognathus vituli*. O risco de transmissão iatrogénico depende do volume e do nível de parasitemia do sangue transferido e da capacidade do parasita sobreviver fora de um hospedeiro antes de ser inoculado num animal suscetível. Uma transmissão bem sucedida por artrópodes depende do número de artrópodes que se alimentam do animal, o tempo e distância de voo até encontrarem um novo hospedeiro (Hammer *et al.*, 2016).

A transmissão transplacentária, bem como a transferência de agente no colostro é relatada, no entanto, o estudo de Hammer *et al.*, (2016), refere que a presença do organismo em bezerros é negativa, mas que vários animais apresentam níveis positivos de anticorpos contra *Theileria orientalis*. Contudo, os anticorpos maternos possuem um tempo de vida curta (Swilks *et al.*, 2017). Swilks *et al.* (2017) referem uma baixa taxa de transmissão transplacentária, no entanto, os animais jovens apresentam uma elevada taxa de infeção nas primeiras semanas de vida,

compatível com infecção vetorial. A exploração **A**, onde surgiu o primeiro caso, é a única exploração referida que contém apenas animais jovens, com uma média de 8,3 meses, pelo que, apesar de serem animais jovens, e mesmo que a transmissão transplacentária não tenha ocorrido, uma vez que é reportada em baixos níveis, já teriam idade suficiente para desenvolver uma infecção, no entanto, é também a única exploração que apresenta sempre os animais estabulados. Nos primeiros dois meses de vida os animais encontram-se em viteiros individuais, pelo que não possuem contacto direto entre si. Depois dos dois meses de idade, passam para parques conjuntos, divididos por idades. No entanto, são parques sem vegetação, pelo que o contacto com carraças é reduzido. Desta forma, poder-se-á explicar a ausência de registo de infecção nos animais da exploração **A**, mas é necessário salvaguardar a hipótese de não se terem registados casos apenas porque a amostra é baixa e a população da exploração elevada, dado que é o local onde surgiu o vitelo infetado em 2019.

Na infecção por *Theileria orientalis*, a merogonia intralinfocitária é muito curta e, em geral, não é possível detetar parasitas no tecido linfóide por microscopia (Aparna *et al.*, 2011), sendo que na observação microscópica também não foram detetadas formas intralinfocitárias. No entanto, foram detetadas diversas formas intraeritrocitárias compatíveis com esporozoítos de *Theileria orientalis*, apesar de Yam *et al.* (2019) referirem que a microscopia ótica não possui sensibilidade para detetar adequadamente animais portadores. Não foi medida a parasitemia de cada animal, sendo que seria um dado importante, podendo ser efetuado através do método de Ishihara (Ota *et al.*, 2009). Pode existir uma elevada incidência na infecção por *Theileria orientalis* mesmo quando não são detetadas formas parasitárias por observação microscópica, nesses casos são muito úteis os métodos como o PCR, que permite detetar infecções ocultas antes do aparecimento de sinais clínicos nos animais (Ota *et al.*, 2009). Atualmente, o PCR é o método mais indicado para a deteção sensível de *T. orientalis*, sendo uma técnica que pode detetar infecção em bovinos até 2 semanas antes que os eritrócitos infetados possam ser observados ao microscópio ótico (Yam *et al.*, 2019) e 34 dias após a introdução de animais em rebanhos infetados (Jenkins & Bogema, 2016). Pelo que, pode-se ponderar que as amostras positivas ao PCR que não demonstraram formas intraeritrocitárias são provenientes de animais com baixa parasitemia ou infecções recentes. No entanto, não foi possível visualizar-se todos os esfregaços, para avaliar a relação entre os resultados obtidos por PCR e por observação microscópica, uma vez que alguns esfregaços não se apresentavam em boas condições. Deste modo, a experiência do operador que elabora os esfregaços, bem como a experiência de quem os avalia são aspetos cruciais para um bom diagnóstico.

Os organismos de *Anaplasma bovis* são geralmente encontrados em monócitos (Sreekumar *et al.*, 1996), tendo já sido reportado em linfócitos (Chirayath *et al.*, 2012). Os organismos podem apresentar diferentes tamanhos, variando entre 1 a 6 μm , e diferentes formas, sendo a mais comum esférica, com o corpo compacto ou difuso, com aproximadamente 1 μm , sendo menos frequente formas pleomórficas; com a coloração do método de Giemsa as inclusões aparecem em diferentes tons acidófilos como vermelho, roxo escuro, roxo claro e quase preto (Sreekumar

et al., 1996). Podem existir dificuldades na identificação do organismo, uma vez que estes podem ser semelhantes aos detritos celulares fagocitados pelos monócitos e a presença de grânulos azurofílicos nas células mononucleares dificulta o diagnóstico (Sreekumar *et al.*, 1996). Nos esfregaços observados foram apenas detetadas formas nos monócitos, no entanto, apenas foram confirmados três animais positivos para *Anaplasma bovis*, uma vez que as análises individuais não estão concluídas.

Estudos como o de Ooshiro *et al.* (2008), em que 8 em 15 vacas eram positivas em PCR específico para *Anaplasma bovis* nenhum dos animais possuía esfregaço positivo, deste modo pode-se dizer que é frequente a ausência de esfregaços positivos para *Anaplasma bovis* em animais infetados.

A origem dos parasitas nas explorações pode estar relacionada com a globalização. As inúmeras viagens de humanos e dos seus animais de estimação, são um meio de transporte para carraças; como as feiras agrícolas onde muitos produtores açorianos expõe os seus animais, dentro e fora das ilhas e com a importação de animais provenientes da América e do norte da Europa. Os principais fatores de risco para a introdução de agentes numa determinada região são: livre comércio, regionalização, viagens internacionais, intensificação da produção animal, evolução constante de agentes infecciosos, impacto incerto da biotecnologia (George *et al.*, 2002). Um estudo de De La Fuente *et al.*, (2015), conclui que os pássaros são elementos centrais nas redes ecológicas de carraças, hospedeiros e agentes patogénicos transmitidos por carraças, no entanto apenas confere importância à transmissão de *Anaplasma phagocytophilum* e *Borrelia* spp..

Quanto às origens dos animais (Tabela 29), a maioria das explorações não compra animais por rotina, no entanto, o contacto entre animais de diferentes explorações é elevado, devido ao modo de delimitação das pastagens, por muros e fios; além do elevado número de explorações que leva animais para exposição.

Para o futuro, é importante uma pesquisa que englobe uma maior amostra da população bovina, procurando essencialmente explorações que apresentem problemas com infestações por carraças bem como explorações com doença clínica suspeita de coincidir com theileriose oriental ou anaplasmoze monocítica. Existem também explorações que não recorrem a qualquer tipo de controlo parasitário pelo que a pesquisa de agentes transmitidos por carraças apresenta um valor acrescido.

Sendo a primeira referência à presença de *Anaplasma bovis* em Portugal, no nosso conhecimento, seria importante verificar a sua presença em Portugal Continental.

Segundo o relatório efetuado pelo Laboratório de Doenças Parasitárias da Faculdade de Medicina Veterinária – ULisboa foi observado *Babesia* spp. e *Anaplasma marginale* nos esfregaços sanguíneos do vitelo, no entanto, não se encontraram novamente estes agentes, podendo justificar-se pela dimensão da amostra.

O trabalho de pesquisa continua a ser desenvolvido no *Tropical Animal Health and Production Lab*, para futura publicação, pelo que o estudo das prevalências ainda não está

terminado. No entanto, geograficamente é possível observar que *Theileria orientalis* aparenta ter uma ampla distribuição e que as infeções por *Anaplasma bovis* registaram-se em explorações não muito distantes

Uma vez que a existência de agentes transmitidos por carraças não era reconhecida no Arquipélago dos Açores, poderá ter existido um subdiagnóstico ou um diagnóstico diferencial incorreto. Deste modo, o conhecimento dos agentes patogénicos presentes em cada área geográfica é de extrema importância. Assim, o alerta para a existência destes agentes poderá melhorar os aspetos sanitários e de produção animal, bem como diminuir as perdas de produção, que possam ser desconhecidas, uma vez que os custos associados a doenças causadas por bactérias ou protozoários transmitidos por vetores causam numerosos prejuízos (Harrus & Baneth, 2005).

4.5. Conclusão

A realização deste trabalho permitiu concluir que os hemoparasitas de bovinos estão presentes nas explorações leiteiras da região de São Miguel, pelo que constitui uma fonte de informação sobre agentes patogénicos que, até então, não faziam parte dos diagnósticos diferenciais frequentes, possibilitando melhorar o bem-estar dos animais bem como maximizar a sua produção.

É assim importante alertar médicos veterinários para estas afeções uma vez que o seu subdiagnóstico e/ou diagnóstico errado de outras doenças pode estar a ser feito. Não estão conhecidas as perdas económicas que podem estar a ocorrer na ilha de São Miguel devido a infeções por agentes transmitidos por carraças, sendo um dos principais prejuízos as quebras de produção.

Por outro lado, não era conhecido a presença de *Anaplasma bovis* em Portugal, o que se traduz numa nova referência a mais um agente transmitido por carraças no país.

Para o conhecimento epidemiológico destes agentes, nesta e noutras ilhas do arquipélago, são necessários mais estudos.

5. Considerações Finais

A realização dos estágios curriculares permitiu consolidar conhecimentos teóricos e aplicá-los de forma prática, com o objetivo de adquirir e melhorar competências na área de clínica e cirurgia de bovinos, sendo também importante de referir a aquisição de outras competências nomeadamente na área de diagnóstico laboratorial de agentes transmitidos por carraças. A elaboração do relatório de estágio permitiu à autora fortalecer os conhecimentos teóricos adquiridos.

O conhecimento da epidemiologia de diferentes doenças é de extrema importância para a elaboração de diagnósticos diferenciais corretos, pelo que a constante pesquisa de agentes patogénicos permite a atualização de conhecimento epidemiológico em permanente evolução.

6. Referências bibliográficas

- AASM-CUA (Associação Agrícola de São Miguel – Cooperativa União Agrícola). Acedido a 08 de fevereiro de 2020 <http://aasm-cua.com.pt/aDefInfTec.asp?ID=128>
- Abdullah, D. A., Ali, M. S., Omer, S. G., Ola-Fadunsin, S. D., Ali, F. F., & Gimba, F. I. (2019). Prevalence and climatic influence on hemoparasites of cattle and sheep in Mosul, Iraq. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, 6(4): 492–498.
- Ahmed, J. S., Glass, E. J., Salih, D. A., & Seitzer, U. (2008). Review: Innate immunity to tropical theileriosis. *Innate Immunity*, 14(1), 5–12.
- Allsopp, B. A. (2010). Natural history of Ehrlichia ruminantium. *Veterinary Parasitology*, 167(2–4): 123–135.
- Almazan, C. (2018). Immunological control of ticks and tick-borne diseases that impact cattle health and production. *Frontiers in Bioscience*, 23(8): 4659.
- Almeria, S., Castellà, J., Ferrer, D., Ortuño, A., Estrada-Peña, A., & Gutiérrez, J. F. (2001). Bovine piroplasms in Minorca (Balearic Islands, Spain): a comparison of PCR-based and light microscopy detection. *Veterinary Parasitology*, 99(3): 249–259.
- Alvarez, J. A., Rojas, C., & Figueroa, J. V. (2019). Diagnostic Tools for the Identification of Babesia sp. in Persistently Infected Cattle. *Pathogens*, 8(3): 143.
- Angelos, J. A. (2015). Infectious Bovine Keratoconjunctivitis (Pinkeye). *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 31(1): 61–79.
- Aparna, M., Ravindran, R., Vimalkumar, M. B., Lakshmanan, B., Rameshkumar, P., Kumar, K. G. A., & Ghosh, S. (2011). Molecular characterization of Theileria orientalis causing fatal infection in crossbred adult bovines of South India. *Parasitology International*, 60(4): 524–529.
- Araldi, Rodrigo Pinheiro, Assaf, S. M. R., de Carvalho, R. F., de Carvalho, M. A. C. R., de Souza, J. M., Magnelli, R. F., & Beçak, W. (2017). Papillomaviruses: A systematic review. *Genetics and Molecular Biology*, Vol. 40: 1–21.
- Artigo nº4, Capítulo I - Código deontológico Médico-Veterinário
- Ashraf, A., & Imran, M. (2018). Diagnosis of bovine mastitis: from laboratory to farm. *Tropical Animal Health and Production*, Vol. 50: 1193–1202.
- Aubry, P., & Geale, D. W. (2011). A review of Bovine anaplasmosis. *Transboundary and Emerging Diseases*, Vol. 58:1–30.
- Azevedo, C., Pacheco, D., Soares, L., Moitoso, M., Maldonado, J., Guix, R., & Simões, J. (2016). Prevalence of bovine milk pathogens in Azorean pastures: Mobile versus fixed milking machines. *Veterinary Record Open*, 3(1).
- Barth, A. D. (2007). Evaluation of Potential Breeding Soundness of the Bull. *In Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. 228–240.
- Belkahia, H., Ben Said, M., Alberti, A., Abdi, K., Issaoui, Z., Hattab, D., Gharbi, M., & Messadi, L. (2015). First molecular survey and novel genetic variants' identification of Anaplasma

- marginale, A. centrale and A. bovis in cattle from Tunisia. *Infection, Genetics and Evolution*, 34, 361–371.
- Benedet, A., Manuelian, C. L., Zidi, A., Penasa, M., & De Marchi, M. (2019). Invited review: β -hydroxybutyrate concentration in blood and milk and its associations with cow performance. *Animal*, 13(8): 1676–1689.
- Bishop, R. P., Odongo, D., Ahmed, J., Mwamuye, M., Fry, L. M., Knowles, D. P., Nateza, A., Lubega, G., Gwakisa, P., Clausen, P., & Obara, I. (2020). A review of recent research on *Theileria parva*: Implications for the infection and treatment vaccination method for control of East Coast fever. *Transboundary and Emerging Diseases*, 67(S1): 56–67.
- Blowey, R., & Edmondson, P. (2010). Mastitis Control in Dairy Herds. *Journal of Chemical Information and Modeling*, (2), 36.
- Bock, R., & Vos, A. (2001). Immunity following use of Australian tick fever vaccine: a review of the evidence. *Australian Veterinary Journal*, 79(12): 832–839.
- Bock, R., Jackson, L., De Vos, A., & Jorgensen, W. (2004). Babesiosis of cattle. *Parasitology*, 129(S1): S247–S269.
- Boro, P., Kumaresan, A., Singh, A. K., Gupta, D., Kumar, S., Manimaran, A., & Prasad, S. (2014). Expression of short chain fatty acid receptors and pro-inflammatory cytokines in utero-placental tissues is altered in cows developing retention of fetal membranes. *Placenta*, 35(7): 455–460.
- Boro, Prasanta, Kumaresan, A., Pathak, R., Patbandha, T. K., Kumari, S., Yadav, A., Manimaran, A., Baithalu, R. K., Attupuram, N. M., & Mohanty, T. K. (2015). Alteration in peripheral blood concentration of certain pro-inflammatory cytokines in cows developing retention of fetal membranes. *Animal Reproduction Science*, 157: 11–16.
- Branco, S. M. da S. (2010). Caracterização morfológica das lesões de tipo neoplásico em vitelos infectados por *Theileria annulata*. *Univiersidade de Évora*. pp 3
- Branco, S., Orvalho, J., Leitão, A., Pereira, I., Malta, M., Mariano, I., & Peleteiro, M. C. (2010). Fatal cases of *Theileria annulata* infection in calves in Portugal associated with neoplastic-like lymphoid cell proliferation. *Journal of Veterinary Science*, 11(1): 27–34.
- Brown, W. C. (2012). Adaptive immunity to *Anaplasma* pathogens and immune dysregulation: Implications for bacterial persistence. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 35(3): 241–252.
- Bursakov, S. A., & Kovalchuk, S. N. (2019). Co-infection with tick-borne disease agents in cattle in Russia. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 10(3): 709–713.
- Cabezas-Cruz, A., Zwegarth, E., & Aguiar, D. M. (2019). *Ehrlichia minasensis*, an old demon with a new name. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 10(4), 828–829.
- Caixeta, L. S., Herman, J. A., Johnson, G. W., & McArt, J. A. A. (2018). Herd-Level Monitoring and Prevention of Displaced Abomasum in Dairy Cattle. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 34(1): 83–99.
- Catalano, D., Biasibetti, E., Lynen, G., Di Giulio, G., De Meneghi, D., Tomassone, L., Valenza,

- F., & Capucchio, M. T. (2015). "Ormilo disease" a disorder of zebu cattle in Tanzania: bovine cerebral theileriosis or new protozoan disease? *Tropical Animal Health and Production*, 47(5): 895–901.
- Ceci, L., Iarussi, F., Greco, B., Lacinio, R., Fornelli, S., & Carelli, G. (2014). Retrospective study of hemoparasites in cattle in southern Italy by reverse line blot hybridization. *Journal of Veterinary Medical Science*, 76(6), 869–875.
- Chirayath, D., Lakshamanan, B., Pillai, U. N., Alex, P.C., & Rejitha, T. S. (2012). Occurrence, clinical manifestations and treatment of bovine ehrlichiosis. *Journal Veterinary Animal Science*, 43, 83–84.
- Chiwome, B., Kandiwa, E., Mushonga, B., Sajeni, S., & Habarugira, G. (2017). A study of the incidence of milk fever in Jersey and Holstein cows at a dairy farm in Beatrice, Zimbabwe. *Journal of the South African Veterinary Association*, 88(1): e1–e6.
- Cho, Y.-I., & Yoon, K.-J. (2014). An overview of calf diarrhea - infectious etiology, diagnosis, and intervention. *Journal of Veterinary Science*, 15(1): 1–17.
- Chung, C., Wilson, C., Bandaranayaka-Mudiyanselage, C.-B., Kang, E., Adams, D. S., Kappmeyer, L. S., & McGuire, T. C. (2014). Improved diagnostic performance of a commercial Anaplasma antibody competitive enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5–glutathione S -transferase fusion protein as antigen. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 26(1): 61–71.
- Colloton, J. (2014). Reproductive Ultrasound of Female Cattle. In *Bovine Reproduction*, pp. 326–346.
- Constable, P. D., Hinchcliff, K. W., Done, S. H., & Grunberg, W. (2017). Veterinary medicine: A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses. In *Elsevier*. pp. 769-775; 799-811; 2031-2033; 2144-2149.
- Crosby, F. L., Brayton, K. A., Magunda, F., Munderloh, U. G., Kelley, K. L., & Barbet, A. F. (2015). Reduced infectivity in cattle for an outer membrane protein mutant of Anaplasma marginale. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(6): 2206–2214.
- Cullen, J. N., Yuan, C., Totton, S., Dzikamunhenga, R., Coetzee, J. F., Silva, N., Wang, C., & O'Connor, A. M. (2016). A systematic review and meta-analysis of the antibiotic treatment for infectious bovine keratoconjunctivitis: an update. *Animal Health Research Reviews*, 17(1): 60–75.
- De La Fuente, J., Estrada-Peña, A., Cabezas-Cruz, A., & Brey, R. (2015, October 15). Flying ticks: Anciently evolved associations that constitute a risk of infectious disease spread. *Parasites and Vectors*, Vol. 8.
- Decreto-Lei n.º 79/2011 de 20 de junho Diário da República n.º 117/2011 – 1.ª Série. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas
- Decreto-Lei n.º 142/2006 de 27 de julho Diário da República n.º 144/2006 – 1.ª Série Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas.

- Decreto-lei n.º 157/98 de 09 de junho. Diário da República n.º 133/1998 – 1.ª Série. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas.
- Decreto-lei n.º 244/2000 de 27 de setembro. Diário da República 244/2000 – 1.ª-A Série. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Lisboa
- Decreto-lei n.º 272/2000 de 08 de novembro. Diário da República n.º 258/2000 – 1.ª-A Série. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Lisboa
- DeGaris, P. J., & Lean, I. J. (2008). Milk fever in dairy cows: A review of pathophysiology and control principles. *Veterinary Journal*, 176(1): 58–69.
- Doan, H. T. T., Noh, J. H., Choe, S. E., Yoo, M. S., Kim, Y. H., Reddy, K. E., Van Quyen, D., Nguyen, L. T. K., Nguyen, T. T. D., Kweon, C. H., Jung, S. C., Chang, K. Y. & Kang, S. W. (2013). Molecular detection and phylogenetic analysis of *Anaplasma bovis* from *Haemaphysalis longicornis* feeding on grazing cattle in Korea. *Veterinary Parasitology*, 196(3–4): 478–481.
- Domingos, A., Antunes, S., Borges, L., & Do Rosário, V. E. (2013). Approaches towards tick and tick-borne diseases control. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Vol. 46: 265–269.
- Dugat, T., Leblond, A., Keck, N., Lagrée, A. C., Desjardins, I., Joulie, A., Pradier, S., Durand, B., Boulouis, H. J., & Haddad, N. (2017). One particular *Anaplasma phagocytophilum* ecotype infects cattle in the Camargue, France. *Parasites and Vectors*, 10(1), 371.
- Dumler, J. S., Barbet, A. F., Bekker, C. P. J., Dasch, G. A., Palmer, G. H., Ray, S. C., Rikihisa, Y., & Rurangirwa, F. R. (2001). Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: Unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combi. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol. 51, pp. 2145–2165.
- Durrani, Z., Weir, W., Pillai, S., Kinnaird, J., & Shiels, B. (2012). Modulation of activation-associated host cell gene expression by the apicomplexan parasite *Theileria annulata*, *Cellular Microbiology*, 14(9): 1434–1454.
- Eddy, R. G., Blowey, R. W., Boyd, H., & Andrews, A. H. (2004). Major Metabolic Disorders. In *Bovine Medicine: Diseases and Husbandry of Cattle*. In *Bovine Medicine: Diseases and Husbandry of Cattle*, pp. 748-750; 919-921.
- Edital n.º53 – Febre Catarral Ovina Língua Azul. 23 de setembro de 2020. Direção Geral de Alimentação e Veterinária. Lisboa
- Edital n.º 1 - Tuberculose em Caça Maior. 29 de abril de 2011. Direção Geral de Alimentação e Veterinária.
- Elsify, A., Sivakumar, T., Nayel, M., Salama, A., Elkhtam, A., Rizk, M., Mosaab, O., Sultan, K., Elsayed, S., Igarashi, I., & Yokoyama, N. (2015). An epidemiological survey of bovine *Babesia* and *Theileria* parasites in cattle, buffaloes, and sheep in Egypt. *Parasitology International*, 64(1), 79–85.

- Ely, V. L., Vargas, A. C., Costa, M. M., Oliveira, H. P., Pötter, L., Reghelin, M. A., ... Botton, S. A. (2019). *Moraxella bovis*, *Moraxella ovis* and *Moraxella bovoculi*: biofilm formation and lysozyme activity. *Journal of Applied Microbiology*, 126(2): 369–376.
- Facury-Filho, E. J., Carvalho, A. Ú. de, Ferreira, P. M., Moura, M. F., Apolinário, B. C., Santos, L. de P. H., & Ribeiro, M. F. B. (2012). Effectiveness of enrofloxacin for the treatment of experimentally-induced bovine anaplasmosis. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 21(1): 32–36.
- Fecteau, M. E. (2018). Paratuberculosis in Cattle. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, Vol. 34, pp. 209–222.
- Foster, D. (2017). Disorders of Rumen Distension and Dysmotility. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, Vol. 33, pp. 499–512.
- Fukui, Y., & Inokuma, H. (2019). Subclinical infections of *Anaplasma phagocytophilum* and *Anaplasma bovis* in dogs in Ibaraki, Japan. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 72(3): 168–172.
- Funnell, B. J., & Hilton, W. M. (2016). Management and Prevention of Dystocia. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, Vol. 32, pp. 511–522.
- Gallego-Lopez, G. M., Cooke, B. M., & Suarez, C. E. (2019). Interplay between Attenuation- and Virulence-Factors of *Babesia bovis* and Their Contribution to the Establishment of Persistent Infections in Cattle. *Pathogens*, 8(3): 97.
- Garzón-Audor, A., & Oliver-Espinosa, O. (2019). Incidence and risk factors for ketosis in grazing dairy cattle in the Cundi-Boyacencian Andean plateau, Colombia. *Tropical Animal Health and Production*, 51(6): 1481–1487.
- Gebrekidan, H., Perera, P. K., Ghafar, A., Abbas, T., Gasser, R. B., & Jabbar, A. (2019). An appraisal of oriental theileriosis and the *Theileria orientalis* complex, with an emphasis on diagnosis and genetic characterisation. *Parasitology Research*, Vol. 119, pp. 11–22.
- George, J. E., Davey, R. B., & Pound, J. M. (2002). Introduced ticks and tick-borne diseases: the threat and approaches to eradication. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 18(3): 401–416.
- Georges, K., Loria, G., Riili, S., Greco, A., Caracappa, S., Jongejan, F., & Sparagano, O. (2001). Detection of haemoparasites in cattle by reverse line blot hybridisation with a note on the distribution of ticks in Sicily. *Veterinary Parasitology*, 99(4), 273–286.
- Gharbi, M., Souidi, K., Boussaadoun, M.-A., Rejeb, A., Jabloun, S., Gnaoui, A., & Darghouth, M.-A. (2017). Dermatological symptoms in tropical theileriosis (*Theileria annulata* infection), a review. *In Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz* (Vol. 36).
- Gleeson, D., Edwards, P., & O'Brien, B. (2016). Effect of omitting teat preparation on bacterial levels in bulk tank milk. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, 55(2), 169–175.
- Goethert, H. K., & Telford, S. R. (2003). Enzootic transmission of *Anaplasma bovis* in Nantucket cottontail rabbits. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(8), 3744–3747.
- Goff, J. P., Johnson, W. C., Molloy, J. B., Jorgensen, W. L., Waldron, S. J., Figueroa, J. V.,

- Matthee, O., Adams, D. S., McGuire, T. C., Pino, I., Mosqueda, J., Palmer, G. H., Carlos e Suarez, Knowles, D. P., McElwain, T. F. (2008). The monitoring, prevention, and treatment of milk fever and subclinical hypocalcemia in dairy cows. *Veterinary Journal*, 176(1), 50–57.
- Gomes, J., Soares, R., Santos, M., Santos-Gomes, G., Botelho, A., Amaro, A., & Inácio, J. (2013). Detection of Theileria and Babesia infections amongst asymptomatic cattle in Portugal. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 4(1–2): 148–151.
- Grandi, G., Aspán, A., Pihl, J., Gustafsson, K., Engström, F., Jinnerot, T., Chirico, J. (2018). Detection of Tick-Borne Pathogens in Lambs Undergoing Prophylactic Treatment Against Ticks on Two Swedish Farms. *Frontiers in Veterinary Science*, 5(APR): 72.
- Gray, J. S. (1985). Ticks: their economic importance and methods of control. *Outlook on Agriculture*, 14(3): 136–142.
- Griffin, D., Chengappa, M. M., Kuszak, J., & McVey, D. S. (2010, July). Bacterial pathogens of the bovine respiratory disease complex. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, Vol. 26, pp. 381–394.
- Grissett, G. P., White, B. J., & Larson, R. L. (2015, May 1). Structured Literature Review of Responses of Cattle to Viral and Bacterial Pathogens Causing Bovine Respiratory Disease Complex. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, Vol. 29, pp. 770–780.
- Guo, H., Yin, C., Galon, E. M., Du, J., Gao, Y., Adjou Moumouni, P. F., Xuan, X. (2018). Molecular survey and characterization of Theileria annulata and Ehrlichia ruminantium in cattle from Northwest China. *Parasitology International*, 67(6): 679–683.
- Guo, H., Adjou Moumouni, P. F., Thekisoe, O., Gao, Y., Liu, M., Li, J., Xuan, X. (2019a). Genetic characterization of tick-borne pathogens in ticks infesting cattle and sheep from three South African provinces. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 10(4): 875–882.
- Guo, W.-P., Wang, X., Li, Y.-N., Xu, G., Wang, Y.-H., & Zhou, E.-M. (2019b). GroEL gene typing and genetic diversity of Anaplasma bovis in ticks in Shaanxi, China. *Infection, Genetics and Evolution*, 74, 103927.
- Hafez, E. S. E., & Hafez, B. (2000). Reproduction in Farm Animals (7th ed.), *Wiley-Blackwell*, pp. 396.
- Hajdušek, O., Šíma, R., Ayllón, N., Jalovecká, M., Perner, J., de la Fuente, J., & Kopáček, P. (2013). Interaction of the tick immune system with transmitted pathogens. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, Vol. 3(26)
- Hammac, G. K., Pierlé, S. A., Cheng, X., Scoles, G. A., & Brayton, K. A. (2014). Global transcriptional analysis reveals surface remodeling of Anaplasma marginale in the tick vector. *Parasites and Vectors*, 7(1): 193.
- Hammer, J. F., Jenkins, C., Bogema, D., & Emery, D. (2016). Mechanical transfer of Theileria orientalis: Possible roles of biting arthropods, colostrum and husbandry practices in disease transmission. *Parasites and Vectors*, 9(1).
- Harrus, S., & Baneth, G. (2005). Drivers for the emergence and re-emergence of vector-borne protozoal and bacterial diseases. *International Journal for Parasitology*, 35(11–12), 1309–

1318.

- Harrus, S., Perlman-Avrahami, A., Mumcuoglu, K. Y., Morick, D., Eyal, O., & Baneth, G. (2011). Molecular detection of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma bovis*, *Anaplasma platys*, *Candidatus Midichloria mitochondrii* and *Babesia canis vogeli* in ticks from Israel. *Clinical Microbiology and Infection*, 17(3), 459–463.
- Härtel, H., Nikunen, S., Neuvonen, E., Tanskanen, R., Kivelä, S. L., Aho, P., Soveri, T., & Saloniemi, H. (2004). Viral and bacterial pathogens in bovine respiratory disease in Finland. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 45(4): 193–200.
- Hartnack, A. K. (2017). Spinal Cord and Peripheral Nerve Abnormalities of the Ruminant. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 33(1): 101–110.
- Hasanpour, A., Moghaddam, G. A., & Nematollahi, A. (2008). Biochemical, hematological, and electrocardiographic changes in buffaloes naturally infected with *Theileria annulata*. *Korean Journal of Parasitology*, 46(4): 223–227.
- Homer, M. J., Aguilar-Delfin, I., Telford, S. R., Krause, P. J., & Persing, D. H. (2000). Babesiosis. *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 13, pp. 451–469.
- Hove, P., Khumalo, Z. T. H., Chaisi, M. E., Oosthuizen, M. C., Brayton, K. A., & Collins, N. E. (2018). Detection and characterisation of *Anaplasma marginale* and *A. centrale* in South Africa. *Veterinary Sciences*, Vol. 5.
- <https://kasvi.com.br/esfregaco-de-sangue-hematologia/>. Acedido a 3 de junho de 2020.
- Humer, E., Aschenbach, J. R., Neubauer, V., Kröger, I., Khiaosa-ard, R., Baumgartner, W., & Zebeli, Q. (2018). Signals for identifying cows at risk of subacute ruminal acidosis in dairy veterinary practice. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 102(2): 380–392.
- Hurtado, O. J. B., & Giraldo-Ríos, C. (2019). Economic and Health Impact of the Ticks in Production Animals. In *Ticks and Tick-Borne Pathogens*.
- Imhof, S., Luternauer, M., Hüsler, J., Steiner, A., & Hirsbrunner, G. (2019). Therapy of retained fetal membranes in cattle: Comparison of two treatment protocols. *Animal Reproduction Science*, 206: 11–16.
- Jalovecka, M., Hajdusek, O., Sojka, D., Kopacek, P., & Malandrin, L. (2018). The complexity of piroplasms life cycles. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, Vol. 8.
- Jalovecka, M., Sojka, D., Ascencio, M., & Schnittger, L. (2019). *Babesia* Life Cycle – When Phylogeny Meets Biology. *Trends in Parasitology*, Vol. 35, pp. 356–368.
- Jenkins, C., Micallef, M., Alex, S. M., Collins, D., Djordjevic, S. P., & Bogema, D. R. (2015). Temporal dynamics and subpopulation analysis of *Theileria orientalis* genotypes in cattle. *Infection, Genetics and Evolution*, 32, 199–207.
- Jenkins, C., & Bogema, D. R. (2016). Factors associated with seroconversion to the major piroplasm surface protein of the bovine haemoparasite *Theileria orientalis*. *Parasites and Vectors*, 9(1).
- Jeong, J. K., Choi, I. S., Moon, S. H., Lee, S. C., Kang, H. G., Jung, Y. H., Park, S.B., Kim, I. H. (2018). Effect of two treatment protocols for ketosis on the resolution, postpartum health,

- milk yield, and reproductive outcomes of dairy cows. *Theriogenology*, 106: 53–59.
- Jones, T. (2016). Treatment of clinical mastitis in dairy cattle. *Veterinary Record*, 178(24): 614.1-614.
- Jurković, D., Mihaljević, Ž., Duvnjak, S., Silaghi, C., & Beck, R. (2020). First reports of indigenous lethal infection with *Anaplasma marginale*, *Anaplasma bovis* and *Theileria orientalis* in Croatian cattle. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 11(5), 101469.
- Kakati, P., Sarmah, P. C., Ray, D., Bhattacharjee, K., Sharma, R. K., Barkalita, L. M., Sarma, D. K., Baishva, B. C., Borah, P., & Stanley, B. (2015). Emergence of oriental theileriosis in cattle and its transmission through *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in Assam, India. *Veterinary World*, 8(9), 1099–1104.
- Kaleibar, M. T., Ashrafi Helan, J., & Fathi, E. (2014). Occurrence of congenital cerebral theileriosis in a newborn twin Holstein calves in Iran: Case report. *Veterinary Research Forum: An International Quarterly Journal*, 5(3), 237–241.
- Kandeel, S. A., Morin, D. E., Calloway, C. D., & Constable, P. D. (2018). Association of California Mastitis Test Scores with Intramammary Infection Status in Lactating Dairy Cows Admitted to a Veterinary Teaching Hospital. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 32(1):497–505.
- Karbowiak, G., Biernat, B., Stańczyk, J., Werszko, J., Szewczyk, T., & Sytykiewicz, H. (2018). The role of particular ticks developmental stages in the circulation of tick-borne pathogens in Central Europe. 5. Borreliaceae. *Annals of Parasitology*, 64(3): 151–171.
- Kocan, K. M., De la Fuente, J., Guglielmone, A. A., & Meléndez, R. D. (2003). Antigens and Alternatives for Control of *Anaplasma marginale* Infection in Cattle. *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 16, pp. 698–712.
- Kocan, K. M., de la Fuente, J., Blouin, E. F., Coetzee, J. F., & Ewing, S. A. (2010). The natural history of *Anaplasma marginale*. *Veterinary Parasitology*, 167(2–4): 95–107.
- Kowalski, A. P., Maboni, G., Gressler, L. T., Espíndola, J. P., Balzan, C., Tasca, C., Guizzo, J. A., Conceição, F. R., Frandoloso, R., & Vargas, A. C. (2017). Antigenic characterization of *Moraxella bovis*, *Moraxella bovoculi* and *Moraxella ovis* strains with potential use in vaccines. *Veterinary Microbiology*, 210: 56–63.
- Krömker, V., & Leimbach, S. (2017). Mastitis treatment-Reduction in antibiotic usage in dairy cows. *Reproduction in Domestic Animals*, 52: 21–29.
- Kuipers, A., Kooops, W. J., & Wemmenhove, H. (2016). Antibiotic use in dairy herds in the Netherlands from 2005 to 2012. *Journal of Dairy Science*, 99(2): 1632–1648.
- Lawrence, K. E., Gedye, K., & Pomroy, W. E. (2019). A longitudinal study of the effect of *Theileria orientalis* Ikeda type infection on three New Zealand dairy farms naturally infected at pasture. *Veterinary Parasitology*, 276: 108977.
- Lehner, S., Zerbin, I., Doll, K., Rehage, J., & Distl, O. (2018). A genome-wide association study for left-sided displacement of the abomasum using a high-density single nucleotide polymorphism array. *Journal of Dairy Science*, 101(2): 1258–1266.
- Lempereur, L., Beck, R., Fonseca, I., Marques, C., Duarte, A., Santos, M., Zúquete, S., Gomes,

- J., Walder, G., Domingos, A., Antunes, S., Baneth, G., Silaghi, C., Holman, P., & Zintl, A. (2017). Guidelines for the Detection of Babesia and Theileria Parasites. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 17(1): 51–65.
- Li, X.-W., Xu, Q.-S., Zhang, R.-H., Yang, W., Li, Y., Zhang, Y.-M., Li, X.-B. (2018). Ultrasonographic findings in cows with left displacement of abomasum, before and after reposition surgery. *BMC Veterinary Research*, 14(1): 44.
- Li, J., Liu, X., Mu, J., Yu, X., Fei, Y., Chang, J., Bi, Y., Zhou, Y., Ding, Z., & Yin, R. (2019). Emergence of a Novel Ehrlichia minasensis Strain, Harboring the Major Immunogenic Glycoprotein trp36 with Unique Tandem Repeat and C-Terminal Region Sequences, in Haemaphysalis hystricis Ticks Removed from Free-Ranging Sheep in Hainan Province, China. *Microorganisms*, 7(9): 369.
- Liu, Z., Ma, M., Wang, Z., Wang, J., Peng, Y., Li, Y., Guan, G., Luo, J., & Yin, H. (2012). Molecular survey and genetic identification of Anaplasma Species in goats from central and southern China. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(2), 464–470.
- Lomillos, J.M., Alonso, M.E. (2019) Síndrome respiratória bovina. *Albeitar*, 1: 34-38
- Loy, J. D., Dickey, A. M., & Clawson, M. L. (2018). Complete Genome Sequence of Moraxella bovis Strain Epp-63 (300), an Etiologic Agent of Infectious Bovine Keratoconjunctivitis. *Microbiology Resource Announcements*, 7(8).
- Mans, B. J., Pienaar, R., & Latif, A. A. (2015). A review of Theileria diagnostics and epidemiology. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, Vol. 4, pp. 104–118.
- Marcelino, I., Martinho De Almeida, A., Ventosa, M., Pruneau, L., Meyer, D. F., Martinez, D., Lefrançois, T., Vachiéry, N., & Varela Coelho, A. (2012). Tick-borne diseases in cattle: Applications of proteomics to develop new generation vaccines☆. *Journal of Proteomics*, 75: 4232–4250.
- McAloon, C. G., Roche, S., Ritter, C., Barkema, H. W., Whyte, P., More, S. J., Doherty, M. L. (2019). A review of paratuberculosis in dairy herds — Part 1: Epidemiology. *Veterinary Journal*, Vol. 246, pp. 59–65.
- Megumi, I., Takahiro, A., Yoshie, S., Naoki, S., Hisashi, I., Satoshi, K., & Kazutaka, Y. (2017). Fluoroscopic Observation of the Development of Displaced Abomasum in Dairy Cows. *The Journal of Veterinary Medical Science*.
- Mein G.A., Neijenhuis F., M. W. F., Reinemann D.J., Hillertins J.E., B. J. R., & Ohstad I., Rasmussen M.D., Timms L., Britt J.S., Farnsworth R., Cook N., H. T. (2001). Teat Scorer – Food Animal Production Medicine – UW–Madison. Evaluation of bovine teat condition in commercial dairy herds: Non-infectious factors. *Second international symposium on mastitis and milk quality proceedings*. Retirado de <https://www.vetmed.wisc.edu/fapm/svm-dairy-apps/teat-scorer/> , a 8 de março de 2020
- Meneghi, D. D., Stachurski, F., & Adakal, H. (2016). Experiences in tick control by acaricide in the traditional cattle sector in Zambia and Burkina Faso: Possible environmental and public health implications. *Frontiers in Public Health*, Vol. 4.

- Merino, O., Alberdi, P., Pérez De La Lastra, J. M., & de la Fuente, J. (2013). Tick vaccines and the control of tick-borne pathogens. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, Vol. 4, p. 30.
- Mohammed, E. S., & Elshahawy, I. (2018). The current prevalence of bovine babesiosis and theileriosis infection in Egypt. *Journal of Bacteriology & Mycology*, 6(6):306–311.
- Moore, A., & Strickland, L. (2018). Bovine Anaplasmosis.
- Morrison, W. I., Hemmink, J. D., & Toyé, P. G. (2020). *Theileria parva*: a parasite of African buffalo, which has adapted to infect and undergo transmission in cattle. *International Journal for Parasitology*.
- Mosqueda, A. Olvera-Ramirez, G. Aguilar-Tipacamu, & G. J. Canto. (2012). Current Advances in Detection and Treatment of Babesiosis. *Current Medicinal Chemistry*, 19(10): 1504–1518.
- Moumène, A., & Meyer, D. F. (2016). Ehrlichia's molecular tricks to manipulate their host cells. *Microbes and Infection*, Vol. 18, pp. 172–179.
- Mueller, K. (2011). Diagnosis, treatment and control of left displaced abomasum in cattle. *In Practice*, 33(9): 470–481.
- Nene, V., & Morrison, W. I. (2016). Approaches to vaccination against *Theileria parva* and *Theileria annulata*. *Parasite Immunology*, 38(12): 724–734.
- Nene, Vishvanath, Kiara, H., Lacasta, A., Pelle, R., Svitek, N., & Steinaa, L. (2016). The biology of *Theileria parva* and control of East Coast fever – Current status and future trends. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 7(4): 549–564.
- Newcomer, B. W., & Chamorro, M. F. (2016). Distribution of lameness lesions in beef cattle: A retrospective analysis of 745 cases. *Canadian Veterinary Journal*, 57(4): 401–406.
- Nicholson, W. L., Sonenshine, D. E., Noden, B. H., & Brown, R. N. (2019). Ticks (Ixodida). *In Medical and Veterinary Entomology* (p. 655).
- Noaman, V. (2012). Comparison of molecular and microscopic technique for detection of *Theileria* spp. in carrier cattle. *Journal of Parasitic Diseases*, 38(1), 64–67.
- Oetzel, G. R. (2017). Diagnosis and Management of Subacute Ruminal Acidosis in Dairy Herds. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, Vol. 33, pp. 463–480.
- OIE. World Organisation For Animal Health. (2019). Manual de testes de diagnóstico e vacinas para animais terrestres. Retirado de <https://www.oie.int/standard-setting/terrestrial-manual/access-online/> a de fevereiro de 2020
- Ok, M., Yildiz, R., Hatipoglu, F., Baspinar, N., Ider, M., Üney, K., Ertürk, A., Durgut, M. K., & Terzi, F. (2020). Use of intestine-related biomarkers for detecting intestinal epithelial damage in neonatal calves with diarrhea. *American Journal of Veterinary Research*, 81(2): 139–146.
- Oliveira, A. C., Luz, M. F., Granada, S., Vilhena, H., Nachum-Biala, Y., Lopes, A. P., Cardoso, L., & Baneth, G. (2018). Molecular detection of *Anaplasma bovis*, *Ehrlichia canis* and *Hepatozoon felis* in cats from Luanda, Angola. *Parasites and Vectors*, 11(1), 1–6.
- Omondi, D., Masiga, D. K., Fielding, B. C., Kariuki, E., Ajamma, Y. U., Mwamuye, M. M., ... Villinger, J. (2017). Molecular detection of tick-borne pathogen diversities in ticks from

- livestock and reptiles along the shores and adjacent Islands of Lake Victoria and Lake Baringo, Kenya. *Frontiers in Veterinary Science*, 4(Jun): 73.
- Ooshiro, M., Zakimi, S., Matsukawa, Y., Katagiri, Y., & Inokuma, H. (2008). Detection of *Anaplasma bovis* and *Anaplasma phagocytophilum* from cattle on Yonaguni Island, Okinawa, Japan. *Veterinary Parasitology*, 154(3–4), 360–364.
- Ota, N., Mizuno, D., Kuboki, N., Igarashi, I., Nakamura, Y., Yamashina, H., Hanzaike, T., Fujii, K., Onoe, S., Hata, H., Kondo, S., Matsui, S., Koga, M., Matsumoto, K., Inokuma, H., & Yokoyana, N. (2009). Epidemiological Survey of *Theileria orientalis* Infection in Grazing Cattle in the Eastern Part of Hokkaido, Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 71(7), 937–944.
- Palomar, A. M., Portillo, A., Santibáñez, P., Mazuelas, D., Roncero, L., García-Álvarez, L., Santibáñez, S., Gutiérrez, O., & Oteo, J. A. (2015). Detection of tick-borne *Anaplasma bovis*, *Anaplasma phagocytophilum* and *Anaplasma centrale* in Spain. *Medical and Veterinary Entomology*, 29(3), 349–353.
- Parente, M., Raposeiro, P., Rodrigues, P., Santos, R. S., Silva, L., Vieira, P., & Vieira, V. (2010). Listagem dos organismos terrestres e marinhos dos Açores (A list of the terrestrial and marine biota from the Azores) (1st ed.; C. Príncipe, ed.). Retirado de http://www.azoresbioportal.angra.uac.pt/files/publicacoes_Listagem_ml.pdf , a 3 de junho de 2020
- Park, J., Chae, J. B., Kim, S., Yu, D. H., Kim, H. C., Park, B. K., Chae, K. S., & Choi, K. S. (2019). Evaluation of the efficacy of ivermectin against *Theileria orientalis* infection in grazing cattle. *BMC Veterinary Research*, 15(1).
- Pathak, R., Prasad, S., Kumaresan, A., Kaur, M., Manimaran, A., & Dang, A. K. (2015). Alterations in cortisol concentrations and expression of certain genes associated with neutrophil functions in cows developing retention of fetal membranes. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 168(3–4): 164–168.
- Peter, S. G., Gakuya, D. W., Maingi, N., & Mulei, C. M. (2019). Prevalence and risk factors associated with Ehrlichia infections in smallholder dairy cattle in Nairobi City County, Kenya. *Veterinary World*, 12(10): 1599–1607.
- Pinto, C., Santos, V. M., Dinis, J., Peleteiro, M. C., Fitzgerald, J. M., Hawkes, A. D., & Smith, B. L. (2005). Pithomycototoxicosis (facial eczema) in ruminants in the Azores, Portugal. *Veterinary Record*, 157(25): 805–810.
- Portaria n.º77/2011 de 13 de setembro. Jornal Oficial da Região Autónoma dos Açores n.º132 – 1.ª Série. Secretaria regional da agricultura e florestas. Governo dos Açores. Ponta Delgada.
- Portaria n.º 111/2018 de 15 de outubro. Jornal Oficial da Região Autónoma dos Açores n.º 123 – 1.ª Série. Secretaria regional da agricultura e florestas. Governo dos Açores. Ponta Delgada.
- Portaria n.º178/2007 de 09 de fevereiro. Diário da República n.º29/2007 – 1.ª Série. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Lisboa.

- Portillo, A., de Sousa, R., Santibáñez, S., Duarte, A., Edouard, S., Fonseca, I. P., Marques, C., Novakova, M., Palomar, A. M., Santos, M., Silaghi, C., Tomassone, L., Zúquete, S., Oteo, J. A. (2017). Guidelines for the Detection of Rickettsia spp. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 17(1): 23–32.
- Postma, G. C., Carfagnini, J. C., & Minatel, L. (2008). Moraxella bovis pathogenicity: An update. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 31(6): 449–458.
- Preiser, P., Kaviratne, M., Khan, S., Bannister, L., & Jarra, W. (2000). The apical organelles of malaria merozoites: host cell selection, invasion, host immunity and immune evasion. *Microbes and Infection*, 2(12), 1461–1477.
- Priyanka, M., Dhanalakshmi, H., Rakesh, R. L., Thimmareddy, P. M., & Narayana Bhat, M. (2017). Monocytic anaplasmosis in a cow: a case report. *Journal of Parasitic Diseases*, 41(3), 687–688.
- Qiu, Y., Nakao, R., Thu, M. J., Akter, S., Alam, M. Z., Kato, S., Katakura, K., & Sugimoto, C. (2016). Molecular evidence of spotted fever group rickettsiae and Anaplasmataceae from ticks and stray dogs in Bangladesh. *Parasitology Research*, 115(3), 949–955.
- Quiroz-Castañeda, R. E., Amaro-Estrada, I., & Rodríguez-Camarillo, S. D. (2016). Anaplasma marginale: Diversity, Virulence, and Vaccine Landscape through a Genomics Approach. *BioMed Research International*, 2016.
- Raboloko, O. O., Ramabu, S. S., Guerrini, L., & Jori, F. (2020). Seroprevalence of Selected Tick Borne Pathogens and Diversity and Abundance of Ixodid Ticks (Acari: Ixodidae) at the Wildlife-Livestock Interface in Northern Botswana. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 187.
- Radostits, O. M., Gay, C. C., Hinchcliff, K. W., & Constable, P. D. (2006). Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, sheep, goats, pigs and horses, 10th edition, *E. H. Sciences*, Ed., pp. 1483-1497.
- Rathinasamy, V., Poole, W. A., Bastos, R. G., Suarez, C. E., & Cooke, B. M. (2019). Babesiosis Vaccines: Lessons Learned, Challenges Ahead, and Future Glimpses. *Trends in Parasitology*, 35(8): 622–635.
- Regulamento (CE) n.º 999/2001 do Parlamento Europeu e do Conselho de 22 de Maio de 2001. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias* n.º L147/14. Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia. Bruxelas.
- Regulamento n.º 853/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de abril. *Jornal Oficial da União Europeia* L139/55. Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia. Bruxelas.
- Rikihisa, Y. (2011). Mechanisms of obligatory intracellular infection with Anaplasma phagocytophilum. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(3): 469–489.
- Ringo, A. E., Adjou Moumouni, P. F., Lee, S. H., Liu, M., Khamis, Y. H., Gao, Y., Guo, H., Zheng, W., Efstratiou, A., Galon, E. M., Li, J., Tiwananthagorn, S., Suzuki, H., Thekisoe, O., & Xuan, X. (2018). Molecular detection and characterization of tick-borne protozoan and rickettsial pathogens isolated from cattle on Pemba Island, Tanzania. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 9(6): 1437–1445.

- Rizk, M. A., Aboulaila, M., El-Sayed, S. A. E. S., Guswanto, A., Yokoyama, N., & Igarashi, I. (2018). Inhibitory effects of fluoroquinolone antibiotics on *Babesia divergens* and *Babesia microti*, blood parasites of veterinary and zoonotic importance. *Infection and Drug Resistance*, 11: 1605–1615.
- Rojas-Martínez, C., Rodríguez-Vivas, R. I., Millán, J. V. F., Bautista-Garfias, C. R., Castañeda-Arriola, R. O., Lira-Amaya, J. J., Urióstegui, P. V., Carrasco, J. J. O., & Martínez, J. A. Á. (2018). Bovine babesiosis: Cattle protected in the field with a frozen vaccine containing *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* cultured in vitro with a serum-free medium. *Parasitology International*, 67(2): 190–195.
- Royster, E., & Wagner, S. (2015). Treatment of Mastitis in Cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 31(1): 17–46.
- Ruegg, P. L. (2002). Udder Hygiene Scoring Chart. *Resources Milk Quality*. Retirado de <https://milkquality.wisc.edu/wp-content/uploads/sites/212/2011/09/udder-hygiene-scoring-chart.pdf>, a 17 de janeiro de 2020
- Rymaszewska, A. & Grenda, S.. (2008). Bacteria of the genus *Anaplasma* – characteristics of *Anaplasma* and their vectors: a review. *Veterinarni Medicina*, 53: 573–584.
- Sanidade Animal, Versão 2, Janeiro 2019 - Direção Geral de Alimentação e Veterinária Direção de Serviços de Proteção Animal
- Schnittger, L., Rodriguez, A. E., Florin-Christensen, M., & Morrison, D. A. (2012). *Babesia*: A world emerging. *Infection, Genetics and Evolution*, Vol. 12, pp. 1788–1809.
- Schubert, C. V., Xue, G., Schmuckli-Maurer, J., Woods, K. L., Nigg, E. A., & Dobbelaere, D. A. E. (2010). The transforming parasite *Theileria* Co-opts host cell mitotic and central spindles to persist in continuously dividing cells. *PLoS Biology*, 8(9).
- Schumaker, T. F., Cooke, R. F., Brandão, A. P., Schubach, K. M., De Sousa, O. A., Bohnert, D. W., & Marques, R. S. (2019). Effects of vaccination timing against respiratory pathogens on performance, antibody response, and health in feedlot cattle. *Journal of Animal Science*, 97(2): 620–630.
- Senturk, S., Cetin, C., Temizel, M., & Ozel, E. (2007). Evaluation of the clinical efficacy of subconjunctival injection of clindamycin in the treatment of naturally occurring infectious bovine keratoconjunctivitis. *Veterinary Ophthalmology*, 10(3): 186–189.
- Seo, M.-G., Kwon, O.-D., & Kwak, D. (2019). *Anaplasma bovis* infection in a horse: First clinical report and molecular analysis. *Veterinary Microbiology*, 233: 47–51.
- Sevilla, E., González, L. M., Luque, D., Gray, J., & Montero, E. (2018). Kinetics of the invasion and egress processes of *Babesia divergens*, observed by time-lapse video microscopy. *Scientific Reports*, 8(1), 1–10.
- Sexton, M., Buckley, W., & Ryan, E. (2007). A study of 54 cases of left displacement of the abomasum: February to July 2005. *Irish Veterinary Journal*, 60(10): 605–609.
- Shaw, M. K. (2003). Cell invasion by *Theileria* sporozoites. *Trends in Parasitology*, 19(1): 2–6.
- Silaghi, C., Santos, A. S., Gomes, J., Christova, I., Matei, I. A., Walder, G., Domingos, A., Bell-

- Sakyi, L., Sprong, H., von Loewenich, F. D., Oteo, J. A., de la Fuente, J., & Dumler, J. S. (2017). Guidelines for the Direct Detection of *Anaplasma* spp. in Diagnosis and Epidemiological Studies. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 17(1), 12–22.
- Silva, M. G., Marques, P. X., & Oliva, A. (2010). Detection of *Babesia* and *Theileria* species infection in cattle from Portugal using a reverse line blotting method. *Veterinary Parasitology*, 174(3–4), 199–205.
- Silva, B. B., Nunes, J., Castro, S., Fonseca, G., & Henrique, A. (2014). Longitudinal study of risk factors for anaplasmosis and transplacental transmission in herd cattle. *Semina: Ciências Agrárias*, 35.
- Silva, J. F. da, Dias-Pereira, P., Carvalho, T., Faustino, A., Correia, J., Pissarra, H., & Stilwell, G. (2016). Manual de Necrópsia Veterinária (Lidel-Ed), Lisboa, pp.3-5.
- Silva, M. G., Villarino, N. F., Knowles, D. P., & Suarez, C. E. (2018). Assessment of Draxxin® (tulathromycin) as an inhibitor of in vitro growth of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and *Theileria equi*. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 8(2): 265–270.
- Simas, P. V. M., Bassetto, C. C., Giglioti, R., Okino, C. H., de Oliveira, H. N., & de Sena Oliveira, M. C. (2020). Use of molecular markers can help to understand the genetic diversity of *Babesia bovis*. *Infection, Genetics and Evolution*, 79.
- Simões, J., Branco, M., Andrade, J., & Müller, A. (2019). Phenotypic antimicrobial susceptibility of environmental bacteria from mastitic milk of pastured dairy cows of S. Miguel (Azores). *Tropical Animal Health and Production*: 1–8.
- Sivakumar, T., Igarashi, I., & Yokoyama, N. (2016). *Babesia ovata*: Taxonomy, phylogeny and epidemiology. *Veterinary Parasitology*, Vol. 229, pp. 99–106.
- Sivakumar, T., Lan, D. T. B., Long, P. T., Viet, L. Q., Weerasooriya, G., Kume, A., Yokoyama, N. (2018). Serological and molecular surveys of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* among native cattle and cattle imported from Thailand in Hue, Vietnam. *Journal of Veterinary Medical Science*, Vol. 80, pp. 333–336.
- Smith, B. P. (2015). Large Animal Internal Medicine, *Elsevier*, pp.1054-1056
- Sondgeroth, K. S., McElwain, T. F., Ueti, M. W., Scoles, G. A., Reif, K. E., & Lau, A. O. T. (2014). Tick passage results in enhanced attenuation of *Babesia bovis*. *Infection and Immunity*, 82(10), 4426–4434.
- Spickler, A. R. (2013). Ehrlichiosis and Anaplasmosis: Zoonotic Species. Retirado de www.cfsph.iastate.edu, a 15 de março de 2020.
- Spickler, A. R. (2015). Erliquiose bovina. Retirado de www.cfsph.iastate.edu, a 15 de março de 2020.
- Spickler, A. R. (2018). Bovine Babesiosis. Retirado de www.cfsph.iastate.edu, a 15 de março de 2020.
- Spickler, A. R. (2019). Theileriosis in Cattle and Small Ruminants. Retirado de <http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/factsheets.php>, a 15 de março de 2020.

- Sreekumar, C., Anandan, R., Balasundaram, S., & Rajavelu, G. (1996). Morphology and staining characteristics of Ehrlichia bovis. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 19(1), 79–83.
- Staniec, M., Adaszek, Ł., Winiarczyk, M., Skrzypczak, M., Nowakiewicz, A., Buczek, K., & Winiarczyk, S. (2018). Detection of Babesia occultans protozoa in cattle from territory of eastern Poland. *Tierärztliche Praxis Ausgabe G: Grosstiere - Nutztiere*, 46(4): 257–259.
- Steinaa, L., Svitek, N., Awino, E., Njoroge, T., Saya, R., Morrison, I., & Toye, P. (2018). Immunization with one Theileria parva strain results in similar level of CTL strain-specificity and protection compared to immunization with the three-component Muguga cocktail in MHC-matched animals. *BMC Veterinary Research*, 14(1): 145.
- Stilwell, G. (2013). *Clínica de Bovinos 1ª edição*; Publicações Ciência & Vida, Lisboa: Bayer, pp 51-55; 61-63; 87-89; 109; 163-164; 195--200; 212; 243-261; 282-284; 288-291
- Suarez, C. E., & Noh, S. (2011). Emerging perspectives in the research of bovine babesiosis and anaplasmosis. *Veterinary Parasitology*, 180(1–2): 109–125.
- Suarez, C. E., Alzan, H. F., Silva, M. G., Rathinasamy, V., Poole, W. A., & Cooke, B. M. (2019). Unravelling the cellular and molecular pathogenesis of bovine babesiosis: is the sky the limit? *International Journal for Parasitology*, Vol. 49, pp. 183–197.
- Swilks, E., Fell, S. A., Hammer, J. F., Sales, N., Krebs, G. L., & Jenkins, C. (2017). Transplacental transmission of Theileria orientalis occurs at a low rate in field-affected cattle: infection in utero does not appear to be a major cause of abortion. *Parasites and Vectors*, 10(1), 227.
- Taylor, M. A., Coop, R. L., & Wall, R. L. (2016). *Veterinary Parasitology* (4th ed.), Wiley Blackwell, pp. xii-xiii; 158-159;398-408.
- The Center for Food Security & Public Health. Imagens de doenças: Heartwater. Retirado de <http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/disease-images.php?name=heartwater&lang=en>, a 15 de junho de 2020.
- Triviño, J.A. (2016) Repercussões económicas da síndrome respiratória bovina, 6: 38-42
- Tuvshintulga, B., Sivakumar, T., Yokoyama, N., & Igarashi, I. (2019). Development of unstable resistance to diminazene aceturate in Babesia bovis. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 9: 87–92.
- Uehlinger, F. D., Clancey, N. P., & Lofstedt, J. (2011). Granulocytic anaplasmosis in a horse from Nova Scotia caused by infection with Anaplasma phagocytophilum. *Canadian Veterinary Journal*, 52(5), 537–540.
- Venjakob, P. L., Borchardt, S., & Heuwieser, W. (2017). Hypocalcemia—Cow-level prevalence and preventive strategies in German dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 100(11): 9258–9266.
- Venjakob, P. L., Pieper, L., Heuwieser, W., & Borchardt, S. (2018). Association of postpartum hypocalcemia with early-lactation milk yield, reproductive performance, and culling in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 101(10): 9396–9405.

- VetAl – Complexo Veterinário do Alto Alentejo. Acedido a 08 de fevereiro de 2020 <https://vetal.pt/#sobre>
- Vidotto, O., & Marana, E. R. M. (2001). Diagnóstico em anaplasmosse bovina. *Ciência Rural*, 31(2): 361–368.
- Wagner, G. G., Holman, P., & Waghela, S. (2002). Babesiosis and heartwater: threats without boundaries. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 18(3): 417–430.
- Watts, J. G., Playford, M. C., & Hickey, K. L. (2016). *Theileria orientalis*: a review. *New Zealand Veterinary Journal*, Vol. 64, pp. 3–9.
- Weaver, A. D., Athnson, O., Guy St. Jean, A. S. (2018). *Bovine Surgery and Lameness*, 3rd Edition (3rd ed.). Wiley Blackwell. pp. 147-152; 267-268.
- WestfaliaSurge. (2006). Teat Cleanliness Scorecard. Retirado de <https://www.qualitycounts.umn.edu/sites/qualitycounts.umn.edu/files/f-mr-2.pdf> , a 8 de março de 2020
- Yabsley, M. J., & Shock, B. C. (2013). Natural history of Zoonotic Babesia: Role of wildlife reservoirs. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, Vol. 2, pp. 18–31.
- Yam, J., Bogema, D. R., & Jenkins, C. (2019). Oriental Theileriosis. *In Ticks and Tick-Borne Pathogens*.
- Yokoyama, N., Okamura, M., & Igarashi, I. (2006). Erythrocyte invasion by Babesia parasites: Current advances in the elucidation of the molecular interactions between the protozoan ligands and host receptors in the invasion stage. *Veterinary Parasitology*, 138(1–2): 22–32.
- Yusuf, J. J. (2017). Review on Bovine Babesiosis and its Economical Importance. *Journal of Veterinary Medicine and Research*, 4(5), 1090.
- Zabel, T. A., & Agosto, F. B. (2018). Transmission Dynamics of Bovine Anaplasmosis in a Cattle Herd. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2018.
- Zaid, T., Ereqat, S., Nasereddin, A., Al-Jawabreh, A., Abdelkader, A., & Abdeen, Z. (2019). Molecular characterization of Anaplasma and Ehrlichia in ixodid ticks and reservoir hosts from Palestine: a pilot survey. *Veterinary Medicine and Science*, 5(2): 230–242.
- Zintl, A., Mulcahy, G., Skerrett, H. E., Taylor, S. M., & Gray, J. S. (2003). Babesia divergens, a Bovine Blood Parasite of Veterinary and Zoonotic Importance. *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 16, pp. 622–636.

Anexo I – Inquérito epidemiológico ao produtor

1. Nome do produtor

2. Localização

(coordenadas GPS)

3. Data de recolha

4. Número de animais no efetivo

5. Modo de produção: pastagem todo o ano? Estabulação? Durante quanto tempo estão estabuladas?

6. Origem dos animais, os animais de reposição têm origem na própria exploração ou compra animais a outras explorações? Explorações apenas da ilha ou tem vacas de outros locais, nomeadamente provenientes do continente ou de outros países?

7. Possui outros animais em contacto com as vacas? (Ex.: Cães, gatos, cabras?)

8. Costuma ver carraças nas vacas? Com que frequência?

9. Desparasita as vacas? Com o quê? Com que regularidade?

10. Costuma fazer administrações aos seus animais? Com que frequência? Que tipo de administrações SC, IM ou IV? Com que regularidade troca de agulha? Administra Partovet® (ocitocina) IV aquando da ordenha?

11. Alguma vez viu animais com uma urina mais escura?

12. Já teve problemas de leptospirose na sua exploração?

Anexo II – Resultados existentes da pesquisa molecular de amostras individuais

Na Tabela 33 observam-se os resultados do PCR individual para pesquisa de *Babesia* spp. e *Theileria* spp. e *Anaplasma* spp. e *Ehrlichia* spp. e na Tabela 34 os resultados da sequenciação genómica de amostras positivas para *Theileria orientalis*.

Tabela 33: Resultados do PCR individual para pesquisa de *Babesia* spp. e *Theileria* spp. e *Anaplasma* spp. e *Ehrlichia* spp.

| Agentes | | Amostra | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
|---|---|------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|
| | | Exploração | | | | | | | | | | | |
| <i>Babesia</i> spp. e <i>Theileria</i> spp. | A | | - | - | - | - | - | - | - | | | - | |
| | B | | | | - | - | - | - | - | + | - | - | |
| | C | | + | - | + | - | - | + | - | - | + | | |
| | D | | | - | - | - | - | + | + | + | - | | |
| | E | | - | - | - | - | + | | | - | | - | |
| | F | | + | - | - | | - | | + | + | + | + | |
| | G | | + | + | + | + | | | | | | | |
| | H | | | | | | | | | | | | |
| | I | | | | | + | | | + | + | + | + | |
| | J | | - | | + | | + | | + | - | + | | |
| <i>Anaplasma</i> spp. e <i>Ehrlichia</i> spp. | F | | + | | | | | | | | | | |
| | I | | | | | + | | | + | - | - | - | |

Tabela 34: Resultados da sequenciação genómica de amostras positivas para *Theileria orientalis*

| Amostras Positivas | Resultados |
|--------------------|----------------------------|
| B8 | <i>Buffeli</i> |
| C1 | <i>Chitose</i> |
| C3 | <i>Chitose</i> |
| C6 | <i>Chitose</i> |
| C9 | <i>Chitose</i> |
| D6 | <i>Chitose</i> |
| D7 | repetir - mau cromatograma |
| D8 | <i>Chitose</i> |
| E5 | por sequenciar |
| F1 | por sequenciar |
| F7 | por sequenciar |
| F8 | por sequenciar |
| F9 | por sequenciar |
| F10 | por sequenciar |
| I4 | <i>Buffeli</i> |
| I7 | <i>Chitose</i> |
| I10 | <i>Buffeli</i> |
| J9 | repetir - mau cromatograma |