



THEILERIOSE TROPICAL EM BOVINOS DE CARNE NA REGIÃO DO ALENTEJO

Dissertação de Natureza Científica

Mestrado Integrado Em Medicina Veterinária

Universidade de Évora

João José dos Santos Marques

Évora, 2011

Orientador: Professor Helder Cortes

Co-orientador: Dr. Evaristo Silva

“Este relatório não inclui as críticas e sugestões feitas pelo júri.”



THEILERIOSE TROPICAL EM BOVINOS DE CARNE NA REGIÃO DO ALENTEJO

Dissertação de Natureza Científica

Mestrado Integrado Em Medicina Veterinária

Universidade de Évora

João José dos Santos Marques

Évora, 2011

Orientador: Professor Helder Cortes

Co-orientador: Dr. Evaristo Silva

“Este relatório não inclui as críticas e sugestões feitas pelo júri.”

Todas as figuras, gráficos e tabelas sem referência são originais do autor.

Agradecimentos

Ao Dr. Evaristo Silva, co-orientador científico do estágio, por todos os conhecimentos práticos e teóricos transmitidos, por todo o apoio, interesse e disponibilidade prestada e sobretudo pela amizade demonstrada.

Ao Professor Helder Cortes, meu orientador na Universidade de Évora, pela disponibilidade e apoio demonstrado, ideias transmitidas e por toda a colaboração neste trabalho.

Ao Dr. Jaime Ribeiro pelos conhecimentos transmitidos, amizade demonstrada e fundamentalmente pela boa disposição e companheirismo proporcionado.

Ao Dr. Telmo Nunes, Professor na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa, por toda a ajuda prestada com a formação na análise epidemiológica dos resultados.

À Doutora Sandra Branco, Professora da Universidade de Évora, pela bibliografia disponibilizada para este trabalho.

Ao Dr. Manuel Malta pela disponibilidade e conhecimentos transmitidos.

À Dra. Sara Pestana pelo convívio partilhado.

Aos Técnicos de Saúde Animal, Luís Pinto e Carlos Martins, pelos conhecimentos práticos transmitidos e sobretudo pela amizade e apoio demonstrados.

Às Auxiliares Veterinárias, Carla Simões e Ana Martins, por toda a simpatia, amizade, boa disposição e apoio demonstrados.

Aos meus pais e irmã que sempre me ajudaram.

Resumo

A Theileriose tropical é uma doença parasitária causada pelo protozoário *Theileria annulata*, transmitida por vectores do género *Hyalomma*. Esta doença representa uma ameaça à produção de bovinos em muitos países, originando graves prejuízos económicas. Em Portugal, as regiões do Alentejo e Ribatejo são consideradas regiões endémicas.

Os objectivos deste estudo foram: identificar e localizar geograficamente explorações infectadas; estimar a prevalência de explorações infectadas; avaliar a seroprevalência de bovinos infectados numa amostragem de 260 animais; alertar para a importância da doença no Alentejo.

Recorrendo ao IFAT com a diluição de 1/160, obteve-se uma prevalência de explorações infectadas de 92,3% e uma seroprevalência de animais infectados de 46,2%. Das explorações em estudo, apenas duas foram consideradas não infectadas.

Os resultados obtidos realçam a importância da Theileriose tropical em Portugal, sendo necessário a aplicação de medidas de controlo eficazes, bem como a comercialização do fármaco de eleição.

Palavras-chave: Theileriose tropical, *Theileria annulata*, *Hyalomma* spp., seroprevalência.

Abstract

Theileriosis is a tick-borne disease caused by the protozoan *Theileria annulata*, which is transmitted by the *Hyalomma* gender. This disease represents a threat to cattle production in many countries, causing serious economic losses. In Portugal, Alentejo and Ribatejo are considered endemic regions.

The objectives of this study were: identify and situate geographically infected farms; estimate the prevalence of infected holdings; evaluate the prevalence of infected cattle on a sample of 260 animals; alert to the importance of the disease in Alentejo.

Using IFAT with the dilution of 1/160, was obtained a prevalence of infected holdings of 92.3% and a seroprevalence of 46.2% of infected animals. Of all farms in this study, only two were considered uninfected.

The results obtained brought to light the importance of tropical theileriosis in Portugal, requiring the application of effective control measures, as well as, marketing the drug of choice.

Key-words: tropical theileriosis, *Theileria annulata*, *Hyalomma* spp., seroprevalence.

Índice Geral

AGRADECIMENTOS	I
RESUMO	II
ABSTRACT	III
ÍNDICE GERAL	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE GRÁFICOS	VIII
ÍNDICE DE TABELAS	IX
LISTA DE ABREVIATURAS	X
I- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA EM THEILERIOSE TROPICAL BOVINA	1
1. Introdução	1
2. Etiologia, Classificação Taxonómica e Biologia	3
2.1. Hospedeiros Vertebrados	4
2.2. Ciclo de Vida da <i>Theileria annulata</i>	5
2.3. Vectores da <i>Theileria annulata</i>	8
3. Epidemiologia	10
3.1. Transmissão	11
3.2. Distribuição Geográfica	12
3.3. Theileriose em Portugal	13
3.4. Factores de Risco	16
4. Patogenia	17
	IV

5. Imunidade	20
6. Sinais Clínicos	25
7. Alterações Laboratoriais	30
8. Lesões Pós-mortem	33
9. Diagnóstico	35
9.1. Diagnóstico Microscópico	35
9.2. Diagnóstico serológico	38
9.2.1. Teste de IFA	38
9.2.2. Teste de ELISA	39
9.3. Diagnóstico Molecular	41
9.3.1. Reacção de Cadeia de Polimerase (PCR)	41
9.3.2. “Reverse Line Blot” (RLB)	43
10. Diagnósticos Diferenciais	44
11. Prognóstico	45
12. Tratamento	45
13. Controlo	49

II- SEROPREVALÊNCIA E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DE THEILERIOSE TROPICAL BOVINA NO ALENTEJO

54

1. Introdução	54
2. Objectivo	56
3. Materiais e Métodos	57
3.1. Localização das Explorações	57
3.2. Caracterização das Explorações em Estudo	58
3.3. Amostragem	60
3.4. Colheita, processamento e Conservação de Amostras	61
3.5. Execução da Técnica de IFA	62
3.6. Validação da Técnica de IFA	63

4. Resultados	64
4.1. Estimativa da Sensibilidade do Teste em Detectar uma Exploração Positiva	66
4.2. Estimativa da Prevalência Real de Explorações Infectadas	67
4.3. Identificação e Localização Geográfica das Explorações Infectadas	68
4.4. Estimativa da Prevalência Real de Animais Infectados	69
5. Discussão	70
6. Conclusão	74
III- BIBLIOGRAFIA	75

Índice de Figuras

Figura 1 - Ciclo de vida da <i>Theileria annulata</i> (adaptado de McKeever,2009).	8
Figura 2 - Vector ixodídeo do género <i>Hyalomma</i> spp.....	9
Figura 3 - Distribuição geográfica da <i>T. annulata</i> (wellcome AHDW "An integrated approach for the development of sustainable methods to control tropical theileriosis", disponível em: http://www.theileria.org , acedido a 15/05/11).....	12
Figura 4 – Possível mecanismo de imunização em infecções por <i>T. annulata</i> (adaptado de Ahmed & Mehlhorn, 1999).	24
Figura 5 - Palidez da mucosa vaginal de um bovino adulto com theileriose tropical (foto gentilmente cedida pelo colega André Matado)	28
Figura 6 - Sinais clínicos observados em vitelos com theileriose tropical: A) adenomegalia do linfonodo pré-escapular; B) mucosa oral pálida e com petéquias; C) exoftalmia unilateral direita; D) nódulos cutâneos.	29
Figura 7 - Diagnóstico microscópico através de esfregaços corados pelo método de Giemsa: A) esquizontes no interior de um macrófago (seta), em esfregaço de baço; B) merozoítos no interior de eritrócitos, em esfregaços de sangue (setas).....	37
Figura 8 – Sinais clínicos observados nos vitelos com theileriose tropical: A) exoftalmia bilateral; B) petéquias na mucosa oral.....	55
Figura 9 - Mapa da localização geográfica das explorações.	57
Figura 10 - Regime extensivo de produção praticado nas explorações em estudo.....	60
Figura 11 – Mapa com a localização geográfica e identificação das explorações positivas e negativas, realizado em função dos resultados obtidos com a diluição de 1/40. As explorações estão localizadas por meio de triângulos. Junto a cada exploração encontra-se um pequeno gráfico circular com as cores vermelha (animais seropositivos/infectados) e verde (animais seronegativos), sendo que foram colhidas 10 amostras por exploração. O triângulo amarelo representa a única exploração identificada como positiva com a diluição de 1/40, mas negativa com a diluição de 1/160.....	69

Índice de Gráficos

Gráfico 1 - Tamanho dos efectivos das explorações em estudo (n=26).	58
Gráfico 2 - Raças de bovinos presentes nas explorações em estudo (n=26). Os números presentes no gráfico representam a quantidade de explorações em estudo, que possuem bovinos de uma determinada raça.	61
Gráfico 3 - Número de bovinos diagnosticados como infectados por exploração em estudo, resultados obtidos com a diluição 1/40 (n=26).	65
Gráfico 4 - Número de bovinos diagnosticados como infectados por exploração em estudo, resultados obtidos com a diluição de 1/160 (n=26).	65
Gráfico 5 – Sensibilidade de rebanho para o tamanho da população em estudo (n = 146) (adaptado de MacDiarmid, 1988).	67

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Classificação e características da <i>Theileria</i> spp. (adaptado de Irvin,1987).	3
Tabela 2 - Comparação dos resultados obtidos através da técnica de IFA, com as diluições de 1/40 e 1/160.....	64
Tabela 3 - Sensibilidade de rebanho com 10 amostras, utilizando a diluição de 1/160 (pelo método de MacDiarmid, 1988).....	66
Tabela 4 - Estimativa da prevalência real de explorações infectadas e respectivo intervalo de confiança, através dos resultados obtidos com a diluição de 1/160 (pelo método de Brown <i>et al.</i> , 2001).....	68
Tabela 5 - Estimativa da prevalência (seroprevalência) real de animais infectados e respectivo intervalo de confiança, através dos resultados obtidos com a diluição de 1/160 (pelo método de Brown <i>et al.</i> , 2001).....	70

Lista de Abreviaturas

ADN – Ácido desoxirribonucleico

ALP – Fosfatase alcalina

ALT – Alanina amino transferase

APTT – Tempo de tromboplastina parcial activada

AST – Aspartato amino transferase

BLS – Leucose bovina esporádica

BLV – Vírus da leucose bovina

BUN – Blood urea nitrogen

cELISA – ELISA competitive

CHCM – Concentração de Hemoglobina corpuscular média

ELISA – *enzyme-linked immunosorbent assay*

GGT – Gama-glutanil transferase

Hb – Hemoglobina

IFA – *Indirect fluorescent antibody*

IFAT - *Indirect fluorescent antibody test* (teste de imunofluorescência indirecto)

IL – interleucina

INF – Interferon

MCV – Volume corpuscular médio

MHC – Major Histocompatibility Complex (Complexo maior de histocompatibilidade)

mRNA – *messenger ribonucleic acid*

NK – *Natural killer*

PBMCs – Peripheral blood mononuclear cells (células mononucleares do sangue periférico)

PCR – *Polymerase chain reaction*

PCV – Packed cell volume (hematócrito)

PT – Tempo de protrombina

RBC – Red blood cell

RLB – Reverse line blot

T CD₄⁺ - Linfócitos T helper

T CD₈⁺ - Linfócitos T citotóxicos

TNF – Factor de necrose tumoral

I- Revisão Bibliográfica em Theileriose Tropical

Bovina

1. Introdução

A *Theileria annulata* foi descrita pela primeira vez em 1904, por Dschunkowsky e Luhs (citado por Centeno Lima, 2001), na antiga região da Transcaucásia, ao que chamaram de *Piroplasma annulatum* (Pipano & Shkap, 2004). Durante as duas décadas seguintes, a theileriose fatal causada por *Theileria annulata* na área do Mediterrâneo e Índia, foi várias vezes atribuída erradamente à infecção por *Theileria mutans* (Pipano & Shkap, 2004).

O conhecimento actual do ciclo de vida da *Theileria annulata* foi obtido através da combinação de estudos *in vivo* e *in vitro* (Mehlhorn & Shein, 1984). Em vez dos termos “macroesquizonte” e “microesquizonte” usado por Barnett *et al.* (1961), Schein *et al.* (1978), utilizaram “esquizonte” e “merozoítos” respectivamente (Mehlhorn *et al.*, 1978).

A *Theileria annulata*, é um protozoário transmitido por carraças, causa theileriose tropical aos bovinos, com alta morbilidade e mortalidade (em jovens), que constitui uma série de limitações à produção pecuária em grandes partes do mundo (Glass *et al.*, 2003). A doença ocorre no sul da Europa, estendendo-se ao sul da Rússia, Médio Oriente, Ásia Central, China, Índia, Norte de África e Sudão, Eritreia e Mauritânia, onde se estima que um total de 250 milhões de bovinos esteja em risco (Mohammad Al-Saeed *et al.*, 2010).

Em vários países em desenvolvimento a theileriose tropical representa um dos principais entraves ao desenvolvimento pecuário e da indústria de produção. Na Tunísia esta doença é uma ameaça importante, particularmente para os pequenos produtores. Em 1994, cerca de 2500 casos clínicos foram registados no país,

Theileriose tropical em bovinos de carne na região do Alentejo

Universidade de Évora, 2011

principalmente em pequenas propriedades rurais de menos de 10 vacas leiteiras (Darghouth, 2008).

Na Tunísia, são declarados anualmente 2500 a 3000 casos de theileriose tropical, sendo uma das mais graves ameaças ao desenvolvimento da produção leiteira, com perdas que variam entre 11,3% em caso de infecções clínicas e 14,8% em casos assintomáticos, principalmente para os pequenos agricultores (Darghouth, 2008, Gharbi *et al.*, 2006).

Num estudo realizado em Minorca, uma pequena ilha das Baleares localizada no Mediterrâneo, foram colhidas amostras de 133 bovinos adultos, ao longo de três épocas diferentes do ano. Nestas procedeu-se ao diagnóstico de infecção por *T. annulata* recorrendo ao PCR (“polymerase chain reaction”) e microscopia electrónica, sendo que a prevalência da infecção foi semelhante ao longo do estudo, o que indica uma situação endémica nesta ilha. Mais de 94% dos animais estudados estavam positivos à presença de *Theileria spp.*, destes, 41,3% foram positivos para *T. annulata* (Almeria *et al.*, 2001).

Em estudos epidemiológicos realizados em diferentes regiões da Turquia, a seroprevalência de theileriose tropical variava entre os 10 e 91% em bovinos. Recentemente, novos estudos realizados no leste da Turquia determinaram uma prevalência de theileriose tropical de 31 % (Aktas *et al.*, 2004).

Na Índia, a doença provoca elevadas perdas económicas em termos de morbilidade, mortalidade e redução da produção de animais recuperados. Estima-se que cerca de 10 milhões de bovinos estejam em risco de contrair a infecção, o que resulta numa perda económica anual que ronda os 800 milhões de dólares americanos (Haque *et al.*, 2010).

Atendendo ao prejuízo económico que a theileriose tropical representa nas regiões endémicas é necessário o recurso a métodos de diagnóstico sensíveis e específicos, que consigam detectar infecções subclínicas e bovinos portadores assintomáticos, de modo a implementar medidas de controlo, incluindo o uso de vacinas vivas atenuadas. Diferentes métodos têm sido desenvolvidos e utilizados no diagnóstico da infecção por *T. annulata*, tais como a PCR, RLB (“reverse line blot”), IFAT

("indirect fluorescent antibody test") e ELISA ("enzyme-linked immunosorbent assay") (Renneker *et al.*, 2009).

2. Etiologia, Classificação Taxonómica e Biologia

A Theileriose é uma doença provocada por espécies do género *Theileria*, durante algum tempo de taxonomia incerta, embora tenha sido incluído no filo Apicomplexa, a sua inclusão neste grupo não foi bem justificada, até que Schein em 1975, demonstrou a existência de estados sexuais do parasita no interior do organismo hospedeiro, a carraça. Actualmente é aceite a seguinte classificação taxonómica de *Theileria* (tabela 1): Sub-reino Protozoa Goldfuss, 1918; Filo Apicomplexa Levine, 1970; Classe Sporozoa Leuckart, 1879; Subclasse Piroplasmae Levine, 1961; Ordem Piroplasmida Wenyon, 1926; Família Theileriidae Du Toit, 1918; Género *Theileria* Bettencourt, França e Borges, 1907 (Navarrete *et al.*, 2002).

Tabela 1 - Classificação e características da *Theileria* spp. (adaptado de Irvin,1987).

Subreino	<i>Protozoa</i>	Eucariótes unicelulares
Filo	<i>Apicomplexa</i>	Presença de complexo Apical em alguns estágios
Classe	<i>Sporozoa</i>	No estágio de esporogonia produz esporozoítos
Subclasse	<i>Piroplasmae</i>	Piriforme, de forma cilíndrica; merozoítos no interior dos eritrócitos
Ordem	<i>Piroplasmida</i>	Reprodução assexuada e provavelmente sexuada; vectores são carraças
Família	<i>Theileriidae</i>	Estágio de esquizonte nos linfócitos
Género	<i>Theileria</i>	Estágio de piroplasma no interior dos eritrócitos

A theileriose resulta da infecção por um protozoário do género *Theileria*, da ordem Piroplasmida. As duas espécies mais importantes em bovinos e búfalos são a *T. parva*, que causa a febre da Costa Este, e a *T. annulata*, responsável pela theileriose tropical. Outras espécies, como a *T. mutans*, *T. buffeli*, *T. velifera*, *T. taurotragi* e *T. sergenti* também podem infectar ruminantes domésticos e selvagens (CFSPH - Center for Food Security and Public Health, 2009).

2.1. Hospedeiros Vertebrados

A theileriose Tropical ou febre da costa do Mediterrâneo é uma infecção provocada pelo protozoário *Theileria annulata*, observada em bovinos, búfalos, zebus e bisontes, que provoca doença grave especialmente em bovinos (Dumanli *et al.*, 2005).

A *Theileria annulata* é mantida na natureza por o ciclo bovino-carraça-bovino. O búfalo de água (*Bubalus bubalis*) é considerado o hospedeiro natural deste parasita. A *T. annulata* normalmente não causa infecção aparente no búfalo de água, mas este último pode funcionar como reservatório para a infecção de carraças. O iaque (*Bos grunniens*) é altamente susceptível a *T. annulata*, sofre graves sinais clínicos e apresenta mortalidade elevada quando infectados (Pipano & Shkap, 2004).

2.2. Ciclo de Vida da *Theileria annulata*

A *T. annulata* possui um ciclo de vida bifásico. A primeira fase do ciclo de vida ocorre no vector artrópode, carraças do género *Hyalomma*, enquanto a segunda fase ocorre no mamífero hospedeiro definitivo, ruminantes domésticos e selvagens (Mehlhorn & Shein, 1984), sendo transmitida transtadialmente (Pipano & Shkap, 2004).

Durante o ciclo, o parasita apresenta reprodução alternada, reprodução sexuada (gametogonia) e multiplicação assexuada (esporogonia) na carraça, e só multiplicação assexuada (merogonia) no hospedeiro vertebrado (Navarrete *et al.*, 2002).

Três dos estados de desenvolvimento da *T. annulata* são infectantes para os hospedeiros vertebrados: os esporozoítos, que se desenvolvem nas glândulas salivares das carraças e no hospedeiro bovino, os esquizontes em macrófagos (monócitos) e os merozoítos nos eritrócitos. Na natureza, a doença é transmitida apenas através dos esporozoítos (Pipano & Shkap, 2004).

O ciclo de vida inicia-se no momento em que a carraça (obrigatoriamente, em fase de ninfa ou adulto) se alimenta num hospedeiro vertebrado. Geralmente, passadas 48 a 72 horas os esporozoítos são encontrados nas glândulas salivares da carraça (Pipano & Shkap, 2004), ocorrendo a sua inoculação com a secreção das mesmas (Navarrete *et al.*, 2002). Os esporozoítos entram nos leucócitos e desenvolvem-se no seu interior, tornando-se esquizontes multinucleado num período de cerca de três dias (Lawrence *et al.*, 2004), também designados por macroesquizontes (figura 1) (Irvin, 1987). Os esquizontes multinucleados apresentam um diâmetro que varia entre 1 e 15 μm (em alguns casos com 27 μm), sendo que a média é de 8 μm (Pipano & Shkap, 2004). Em cultura, os esquizontes, também designados por “corpos azuis de Koch” (Navarrete *et al.*, 2002), contém em média 12 núcleos, mas já foram encontrados alguns com 80 ou mais (Pipano & Shkap, 2004).

Os esporozoítos *Theileria* são imóveis, daí a interacção inicial entre estes e as células do hospedeiro ser um acontecimento fortuito, não dependente da

Theileriose tropical em bovinos de carne na região do Alentejo

Universidade de Évora, 2011

temperatura. Isso resulta numa interacção inicial relativamente forte, do esporozoíto à superfície da célula hospedeira, na medida em que pode ser visto, como um acontecimento irreversível. A interacção e entrada do esporozoíto nas células do hospedeiro ocorre em qualquer orientação, e a invasão não exige reorientação do parasita de modo a direccionar o ápice para o contacto com a membrana da célula do hospedeiro. Este facto contrasta com outros parasitas do filo Apicomplexa, que aquando da interacção com as células do hospedeiro, apresentam sempre o polo apical direccionado para a superfície celular e este participa activamente no processo de invasão (Shaw, 2003).

O processo de entrada dos esporozoítos, não depende do citoesqueleto de actina do parasita, não envolve a formação de uma junção de movimento e não necessita de grande remodelação da superfície celular do hospedeiro ao contrário do que é observado nos Apicomplexa. Com base em evidências morfológicas, o revestimento da superfície do esporozoíto é o principal participante na interacção com a célula do hospedeiro, sendo essa interacção que facilita a internalização do parasita (Shaw, 2003). Os esporozoítos de *T. annulata* invadem preferencialmente os macrófagos dos bovinos (Ahmed *et al.*, 2008), processo que demora em média menos de três minutos após a inoculação (Shaw, 2003). Estes localizam-se inicialmente nos vacúolos destas células, no entanto, a membrana dos vacúolos desaparece 24 horas após a infecção, deixando o parasita livre no citoplasma. No interior dos leucócitos, o parasita atinge o estado de macroesquizonte, induzindo a transformação e proliferação das células do hospedeiro (Ahmed *et al.*, 2008), o que conduz à expansão em clone das células infectadas (Shaw, 2003). De seguida, o esquizonte multinucleado sofre um processo de diferenciação, dando origem aos merozoítos uninucleados, que são libertados na corrente sanguínea onde invadem os eritrócitos (Shaw, 2003), oito a dez dias após a infecção (figura 1) (Ahmed *et al.*, 2008).

Não é comum encontrarem-se esquizontes com micromerozoítos (microesquizontes) na infecção por *Theileria annulata*, ao contrário do observado em *Theileria parva*. Na theileriose tropical, é comum o esquizonte desenvolver-se e crescer como resultado da fissão binária dos seus núcleos. A localização intracelular do

Theileriose tropical em bovinos de carne na região do Alentejo

Universidade de Évora, 2011

esquizonte estimula a multiplicação das células do hospedeiro, resultando na distribuição do material do esquizonte a cada uma das células recém-formadas. Posteriormente, alguns dos esquizontes vão resultar merozoítos, que invadem eritrócitos (Pipano & Shkap, 2004) e originam os piroplasmas (Irvin, 1987).

Uma vez no interior dos eritrócitos, ocorre a reprodução assexuada (fissão binária ou bipartição). Os merozoítos capturados pela carraça, juntamente com os eritrócitos que os albergam, vão até ao aparelho digestivo do artrópode, onde acontece a digestão do glóbulo vermelho, de que resulta a libertação de estruturas radiais ou digitiformes, designados de corpos radiados como consequência da sua morfologia. Estas estruturas darão lugar a formação de gâmetas desiguais, por um lado, microgâmetas (masculinos) filiformes uninucleados e de pequeno tamanho e, por outro lado, macrogâmetas (femininos) de forma ovóide, multinucleados e de 4 a 5 µm de diâmetro (Navarrete *et al.*, 2002).

A fusão entre os dois gâmetas dá origem ao zigoto, que invade as células epiteliais do intestino da carraça. A conclusão do desenvolvimento ocorre em estados imaturos da carraça, apenas quando esta se separa do hospedeiro. A ocorrência de ecdises (fase de muda) na carraça conduz ao aparecimento de formas móveis no interior do zigoto, designado por cineto. Este é libertado para a cavidade do corpo e migra para as glândulas salivares pela hemolinfa. O cineto invade as células epiteliais das glândulas salivares, quase exclusivamente células E tipo III dos ácinos, evoluindo para um grande esporoblasto sincicial (Lawrence *et al.*, 2004). Este permanece nas células alveolares das glândulas salivares até a carraça se fixar a outro hospedeiro para se alimentar, momento em que ocorre a activação dos mecanismos de multiplicação nuclear, dando lugar a formação de cada vez mais núcleos e, mais pequenos, que vão originar os esporozoítos infectantes que ocupam totalmente o alvéolo (Navarrete *et al.*, 2002).

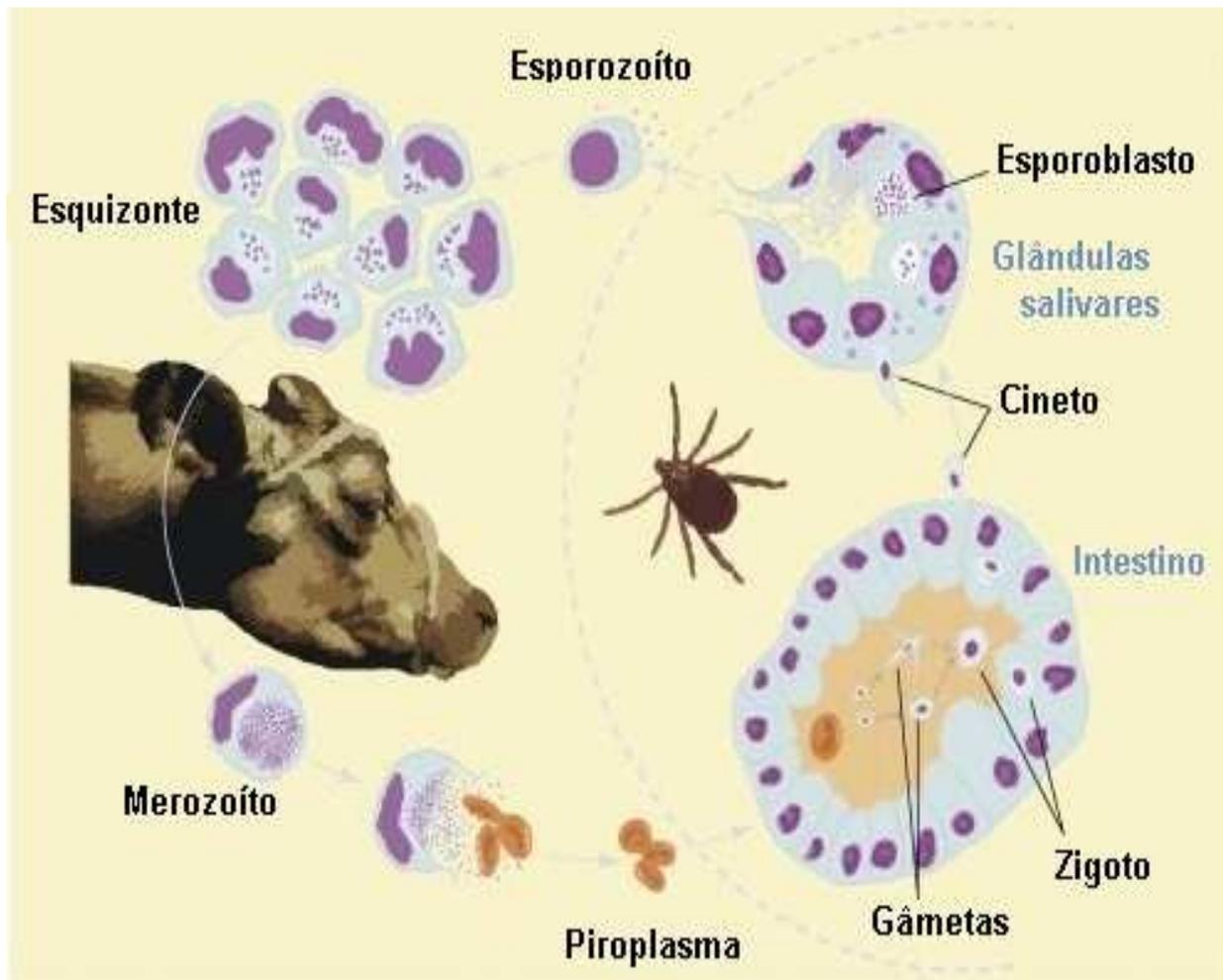


Figura 1 - Ciclo de vida da *Theileria annulata* (adaptado de McKeever, 2009).

2.3. Vetores da *Theileria annulata*

A ocorrência de theileriose tropical depende da presença de ixodídeos infectados (Pipano & Shkap, 2004). Várias espécies de *Hyalomma* (figura 2) têm sido implicadas na transmissão de *Theileria annulata*. Os principais vetores são o *Hyalomma detritum*, *H. anatolicum*, *H. excavatum*, *H. dromedarii* e *H. marginatum* (Aktas *et al.*, 2004).

Um levantamento epidemiológico sobre a infecção por *Theileria annulata* foi realizado em 12 cidades ao redor de Ancara, na Turquia, no período compreendido entre Abril de 1990 a Janeiro de 1993. Durante o levantamento, 198 bovinos de raças

Theileriose tropical em bovinos de carne na região do Alentejo

Universidade de Évora, 2011

locais, foram rastreados para detecção de anticorpos anti-*Theileria annulata* e a presença de vectores. Foram identificadas quatro espécies de carraças do género *Hyalomma*: *H. anatolicum anatolicum*, *H. excavatum anatolicum*, *H. detritum* e *H. marginatum marginatum* (Sayin et al., 2003).

Em Portugal, as principais espécies de vectores do género *Hyalomma*, presentes essencialmente no Alentejo e Ribatejo, são o *Hyalomma lusitanicum* e *Hyalomma marginatum marginatum* (Caeiro, 1999).



Figura 2 - Vector ixodídeo do género *Hyalomma* spp.

3. Epidemiologia

A epidemiologia desta doença depende da presença e distribuição dos vectores do género *Hyalomma*, que necessitam de condições climáticas e ambientais para se desenvolverem, pelo que são considerados parasitas sazonais (Navarrete *et al.*, 2002). Na generalidade das áreas endémicas, a maioria dos casos ocorre entre Junho e Setembro, embora ocorram casos esporádicos ao longo do ano (Pipano & Shkap, 2004).

No ambiente, o conhecimento dos vectores, a sua abundância no gado, a prevalência de infectados (número de carraças infectadas em relação à população de carraças em risco de desenvolver infecção) e a intensidade (abundância de esporoblastos nas glândulas salivares das carraças infectadas) são informações cruciais para o estudo da epidemiologia da theileriose (Aktas *et al.*, 2004). A colheita e posterior coloração das glândulas salivares das carraças (Walker *et al.*, 1979), bem como os casos de infecção *in vitro* de células linfóides de bovinos com esporozoítos (Brown *et al.*, 1973) são considerados ferramentas essenciais para o estudo dos aspectos epidemiológicos desta patologia, permitindo conhecer a importância de cada espécie na transmissão da infecção (Bouattour *et al.*, 1996).

Young (1981), referiu que entender a epidemiologia da theileriose exige um bom conhecimento dos mecanismos envolvidos na manutenção de um estado endémico. Segundo ele, a estabilidade endémica da theileriose depende de uma combinação de mecanismos reguladores envolvidos no desenvolvimento de factores de protecção contra infecção por *Theileria*, do nível de infecção na população de vectores e a população de carraças que parasitam os bovinos (Fandamu, 2005).

3.1. Transmissão

A principal forma de transmissão é através do hospedeiro invertebrado específico (carraças do género *Hyalomma*) ou de forma mecânica/iatrogénica (por exemplo, através de instrumentos cirúrgicos) (Navarrete *et al.*, 2002). A transmissão transovárica não ocorre em parasitas pertencentes ao género *Theileria* (CFSPH - Center for Food Security and Public Health, 2009).

A transmissão da theileriose pelos ixodídeos ocorre de forma transtadial, isto é, se o artrópode ingere o parasita como larva, transmite-o como ninfa, se o ingere como ninfa, transmite-o em adulto. No caso de o ixodídeo adulto alimentar-se de sangue infectado, como se trata de um “fundo de saco” (não existe fase evolutiva posterior a adulto para essa geração), o parasita mantém-se no Hospedeiro invertebrado até à sua morte (Navarrete *et al.*, 2002).

Os esporozoítos de *Theileria annulata* são transmitidos aos animais através da saliva das carraças durante a alimentação, após sofrerem maturação e localizarem-se na saliva do hospedeiro invertebrado, após a fixação deste ao bovino (Bakheit *et al.*, 2004). Segundo Navarrete *et al.* (2002), habitualmente, só após três a cinco dias de fixação é que o vector carraça se torna infectante (Navarrete *et al.*, 2002). No entanto, a proximidade com o hospedeiro vertebrado ou a temperatura do corpo dos mamíferos, pode desencadear a maturação dos esporozoítos, de modo que alguns vectores possam ser infectantes antes da sua alimentação (Pipano & Shkap, 2004).

Os animais que recuperam da infecção por *Theileria annulata*, adquirem um estado de portador latente, em que um número reduzido de hemácias permanece infectado com piroplasmas. Esses animais funcionam como reservatório, contribuindo para a infecção dos ixodídeos do género *Hyalomma*, e conseqüente transmissão da doença (d'Oliveira *et al.*, 1995).

3.2. Distribuição Geográfica

A theileriose tropical é uma doença com elevado impacto económico que ameaça cerca de 250 milhões de bovinos, destacando-se como um dos principais obstáculos à produção animal e melhoria das condições de vida das populações de muitos países (d'Oliveira *et al.*, 1995). A sua distribuição geográfica está intimamente relacionada com a distribuição dos seus vectores (Irvin, 1987), sendo observada no Norte de África e sul da Europa, Rússia, Médio Oriente, Índia e sul da China (figura 3) (d'Oliveira *et al.*, 1995).

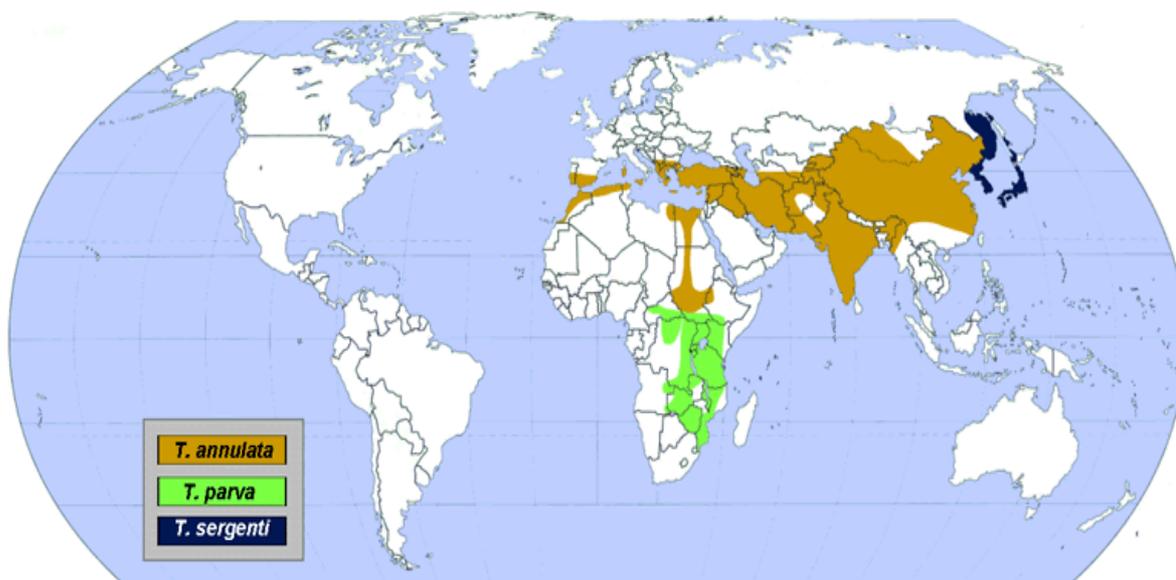


Figura 3 - Distribuição geográfica da *T. annulata* (wellcome AHDW "An integrated approach for the development of sustainable methods to control tropical theileriosis", disponível em: <http://www.theileria.org>, acedido a 15/05/11)

A *Theileria annulata* representa um grave problema epidemiológico, uma vez que os bovinos com theileriose tropical subclínica funcionam como reservatórios da infecção para os ixodídeos, visto que transportam piroplasmas (Dumanli *et al.*, 2005). A notável sazonalidade que esta doença apresenta, coincide com o período de actividade dos vectores adultos do género *Hyalomma*, que são previamente infectados como ninfas antes de transmitirem o parasita na seguinte Primavera - Verão (Habela *et al.*, 1999). A mortalidade associada à theileriose tropical varia entre os 90% em raças

exóticas introduzidas e 5% ou menos em raças autóctones, em algumas das regiões consideradas endémicas (d'Oliveira *et al.*, 1995).

3.3. Theileriose em Portugal

A theileriose tropical, causada por *T. annulata*, é uma das doenças transmitidas por ixodídeos de maior importância em Portugal, particularmente nas regiões do Alentejo e Ribatejo (Brigido *et al.*, 2004). Os parasitologistas portugueses consideram-na uma infecção com patologia leve/moderada, uma vez que a identificação destes parasitas em esfregaços de sangue de animais assintomáticos é frequente (Branco *et al.*, 2010).

A infecção por *Theileria* spp. não tem sido objecto de estudo recente em Portugal, sendo que a única referência publicada em *T. annulata* em Portugal data de 1945 (citado por Branco *et al.*, 2010). Nessa data, Silva Leitão, alertou para a presença de bovinos infectados por *Theileria* spp., documentando alguns casos ocorridos nas zonas de Alvito, Sintra e Mafra. Todos esses casos apresentavam quadros clínicos semelhantes, tendo-se observado parasitas do género *Theileria* em esfregaços de sangue realizados. A *T. annulata* (igual a *T. dispar*) era apontada como a principal suspeita mas, devido aos conhecimentos possuídos na altura relativamente a taxonomia das theilerioses bovinas, não foi possível chegar à conclusão da espécie implicada, tendo apenas sido descartada a espécie *T. parva* (Leitão, 1945).

Das espécies pertencentes ao género *Theileria*, que infectam os bovinos, a *Theileria annulata*, é a única considerada importante em Portugal (Caeiro, 1999). Existem evidências de infecção de bovinos por *T. mutans*, raramente encontrada isolada num animal (quase sempre em associação com *Babesia bovis* e *Anaplasma marginale*), tendo sido considerado um agente com morbilidade desprezível e mortalidade entre 0,5 e 1% (Caeiro, 1982).

O diagnóstico destas infecções em Portugal é realizado através da utilização de métodos serológicos e de microscopia. Num trabalho realizado por Centeno-Lima *et al.*, em bovinos numa herdade na região do Alentejo, através dos métodos de PCR e

Theileriose tropical em bovinos de carne na região do Alentejo

Universidade de Évora, 2011

RLB, revelou 88% (30/34) de animais portadores de *T. annulata*, que não apresentavam sintomatologia (Brigido *et al.*, 2004).

Entre Dezembro de 1999 a Novembro de 2007, 15 bezerros com menos de quatro meses de idade, evidenciando sinais de uma síndrome aguda da doença, levando à morte ou a eutanásia, foram identificados na região sul de Portugal. Após as suspeitas iniciais de infecção pelo BLV (vírus da leucose bovina) e, posteriormente a BLS (leucose bovina esporádica), doença de etiologia desconhecida, concluiu-se com base nos resultados de histopatologia, imunohistoquímica, PCR e análises ao sangue (hemograma e esfregaços), que os casos de doença aguda identificados no sul de Portugal foram causados por *T. annulata*, que gerou elevada morbidade e mortalidade. Uma vez que tais casos não têm sido relatados em Portugal, é possível que estirpes mais patogénicas de *T. annulata* se tenham estabelecido no país ou, que os factores epidemiológicos se tenham alterado, contribuindo para um aumento da carga do parasita ou susceptibilidade do hospedeiro (Branco *et al.*, 2010).

Num estudo recente, pretenderam detectar e identificar as espécies de *Theileria* e *Babesia*, presentes em bovinos, no Centro e Sul de Portugal, através do método de RLB. Foram colhidas aleatoriamente 1104 amostras de sangue a animais clinicamente saudáveis, em quatro distritos diferentes: 98 amostras em duas herdades de Santarém, 348 amostras em 47 herdades em Setúbal, 26 amostras de uma herdade em Évora e 632 amostras de 48 herdades em Beja. Do PCR inicialmente realizado sobre as 1104 amostras resultou, que 279 (25,3%) animais eram negativos, enquanto 825 (74,7%) eram positivos a *Babesia* e/ou *Theileria* sp., sendo que a *Theileria* spp. foi o parasita mais frequentemente encontrado nas amostras de animais positivos, com 83,2% (686/825). A *Theileria buffeli* foi a espécie mais frequentemente encontrada, com percentagem de 69,9% (577/825), quer em infecções mistas (17,5%) como em infecções simples (52,4%), seguida pela *Theileria annulata*, presente em 30,2% (249/825) das amostras positivas, em 12,5% dos casos como infecção única e 17,7% em infecções mistas. Como era esperado, a região sul de Portugal, apresentou a maior percentagem de bovinos infectados com *Babesia* e/ou *Theileria* sp. (variando de 78% para 96%). Este resultado era esperado, uma vez que está em pleno acordo com a

Theileriose tropical em bovinos de carne na região do Alentejo

Universidade de Évora, 2011

distribuição geográfica dos vectores, além de que é uma região mais quente e seca, o que propicia o desenvolvimento e actividade dos ixodídeos (Silva *et al.*, 2010).

A presença da doença está intimamente ligada com a distribuição dos seus vectores ixodídeos. Em Portugal, estão presentes ixodídeos do género *Hyalomma*, responsáveis pela transmissão da theileriose tropical. Estes vectores são encontrados em especial na região do Ribatejo e Alentejo, onde foram identificadas as espécies *Hyalomma lusitanicum* e *Hyalomma marginatum marginatum* (Caeiro, 1999). Na região ibérica, em Portugal e Espanha, apenas as regiões Sul tem registos de *T. annulata*. No entanto, Brígido *et al.* (2004) pretenderam conhecer a prevalência de hemoparasitas num grupo de bovinos de raça Mirandesa localizados no distrito de Bragança. Após a aplicação do método de PCR, observaram que três em 116 animais eram portadores de *Theileria* e/ou *Babesia* sp.. Posteriormente, aplicaram o teste de RLB aos 3 animais positivos e a 34 dos 113 negativos à técnica de PCR, o que detectou a presença de *T. buffeli* nas três amostras positivas, e confirmou o resultado negativo do PCR nas restantes amostras. A confirmação do diagnóstico foi feita por análise filogenética com as sequências de rDNA obtidas, mostrando uma homologia de 99% com a espécie *T. buffeli* (Brígido *et al.*, 2004).

A região norte de Portugal não é considerada uma região de elevada prevalência de vectores ixodídeos (Caeiro, 1999). Este facto pode estar relacionado com condições climáticas predominantes nesta região (temperada com várias zonas de microclima). Além disso, o sistema de exploração animal, onde um pequeno número de animais são confinados em casas, em oposição ao sul, onde os animais são criados em grandes áreas ao ar livre, em regime extensivo. Este facto, associado ao clima Mediterrânico, contribui para que os bovinos estejam mais expostos a um elevado número de vectores do género *Hyalomma* existentes na região sul do país, e com maior risco de infecção por *T. annulata* (Brígido *et al.*, 2004).

3.4. Factores de Risco

Os ixodídeos são considerados parasitas sazonais, uma vez que necessitam de condições climáticas e ambientais favoráveis para o seu desenvolvimento. Deste modo, a presença e distribuição de carraças do género *Hyalomma*, responsáveis pela transmissão de *Theileria annulata*, é um factor determinante na epidemiologia desta hemoparasitose (Navarrete *et al.*, 2002). No Inverno, devido às temperaturas reduzidas, as carraças apresentam baixa actividade, permanecendo em fendas entre as rochas, nas paredes, entre outros lugares. A infecção tende a ser observada principalmente no Verão e início do Outono, uma vez que o estado adulto infectante do vector ocorre no final da Primavera e início do Verão (Taylor *et al.*, 2004).

Quando a temperatura ambiente é baixa, a maturação dos esporozoítos no vector adulto só é completa três a quatro dias após a sua alimentação. Pelo contrário, com temperatura ambiente de 37 °C ou mais elevada, a maturação dos esporozoítos ocorre antes da carraça se alimentar do hospedeiro vertebrado e, a infecção pode ser transmitida logo que esta inicie a sua alimentação (Lawrence *et al.*, 2004).

Um estudo realizado no Sudão determinou que o perfil de anticorpos vai aumentando significativamente com o avançar da idade do animal, e portanto, a idade do animal constitui um factor de risco para a aquisição da infecção. Também os locais onde se encontram os animais, as estações do ano e a gestão dos sistemas de produção foram considerados factores de risco associados ao parasita *Theileria annulata* (Salih *et al.*, 2007).

O regime de exploração praticado pode ser um factor condicionante, visto que, no regime de exploração intensiva os animais encontram-se mais confinados, logo existe maior possibilidade de contágio. Contudo, as condições necessárias à presença dos vectores, são mais facilmente encontradas no regime de exploração extensiva, onde existe erva abundante, temperatura e humidade relativa elevadas, propícias ao desenvolvimento de ixodídeos (Navarrete *et al.*, 2002).

Outro factor condicionante é a raça dos animais. Em raças autóctones, a *Theileria annulata* causa morbilidade e diminuição da produtividade, enquanto as raças importadas ou bovinos resultantes de cruzamentos com raças importadas,

sofrem doença grave que muitas vezes pode ser letal (Ahmed *et al.*, 2008). A introdução de bovinos importados em zonas endémicas, conduz ao aparecimento de doença grave e aumento das taxas de mortalidade, que são de 5-10% em raças autóctones e 80-90% em raças exóticas (Navarrete *et al.*, 2002).

4. Patogenia

A patogenia da theileriose está condicionada por uma série de factores extrínsecos e intrínsecos, tanto dependentes do parasita como do hospedeiro (Navarrete *et al.*, 2002). Para além dos factores relacionados com o hospedeiro, a patogencidade da estirpe de *Theileria* é um factor determinante (Irvin, 1987). A patogencidade de *T. annulata* depende da sua capacidade de invadir os leucócitos do hospedeiro e conduzi-los a um estado de proliferação descontrolada. O tropismo celular também é um factor importante que difere entre as várias espécies de *Theileria*, por exemplo, enquanto *Theileria parva* infecta todas as subpopulações de linfócitos, a *Theileria annulata* infecta monócitos e macrófagos (McKeever, 2009).

A severidade da infecção (letal ou subletal), a proporção de células infectadas por esquizontes e eritrócitos parasitados, a duração e severidade da pirexia, e o aumento de tamanho dos linfonodos estão directamente relacionadas com a quantidade de parasitas inoculados pelo vector ixodídeo. No entanto, o tempo até ao início da febre, ao aparecimento dos esquizontes e merozoítos nos eritrócitos, é inversamente proporcional ao número de esporozoítos inoculados (Pipano & Shkap, 2004).

Recentemente foi demonstrado que a infecção primária por *T. annulata* pode induzir a activação de linfócitos T “aberrantes”, conduzindo a um deficiente resposta imunitária e posteriormente a uma infecção aguda letal. Os esquizontes ao infectarem células não específicas activam os linfócitos T “naive”, ocorrendo nas 48 horas após a infecção, desenvolvimento de um grande número de macrófagos na medula do linfonodo que drena o local da inoculação. Nos quatro dias seguintes à infecção, estes macrófagos activam um grande número de formas inapropriadas de linfócitos T CD4+

Theileriose tropical em bovinos de carne na região do Alentejo

Universidade de Évora, 2011

via MHC classe II (complexo de histocompatibilidade da classe II) na medula, e não no cortex do linfonodo. Este conjunto de eventos origina uma resposta imune ineficaz, uma vez que as células T não se localizam onde anatomicamente é mais comum encontra-lo, não ocorrendo assim a expansão em clone por estimulação antigénica (Pipano & Shkap, 2004).

In vivo, as células “receptoras” de *Theileria annulata* são os fagócitos, enquanto a *T. parva* é encontrada principalmente nos linfócitos T. Assume-se então, que a eficiente transferência dos esquizontes a outras células está associada à sua capacidade de penetrar em novas células do hospedeiro, visto que, as células fagocíticas englobam activamente esquizontes de *T. annulata*. As células infectadas com esquizontes multiplicam-se e metastizam no hospedeiro, disseminando-se rapidamente através do linfonodo que drena o local da inoculação para outros linfonodos, baço e timo. Estas células, também vão afectar órgãos não linfóides, tais como o fígado, rins, pulmão, abomaso, glândulas adrenais e, posteriormente, cérebro e miocárdio (Pipano & Shkap, 2004). É durante esta fase que ocorre aumento de tamanho dos linfonodos próximos do local da inoculação, observando-se hiperplasia (Navarrete *et al.*, 2002). A presença de esquizontes nos linfonodos origina leucopénia, principalmente em infecções letais e subletais, devido a um declínio de linfócitos e neutrófilos em circulação, coincidindo com o início dos sinais de febre (Pipano & Shkap, 2004).

Os esquizontes sofrem um processo de diferenciação dando origem aos merozoítos unicelulares, que são libertados na corrente sanguínea, onde invadem os eritrócitos (Shaw, 2003), oito a dez dias após a infecção (Ahmed *et al.*, 2008). Em infecções graves, mais de 95% dos glóbulos vermelhos encontram-se parasitados, cada um contendo um ou mais merozoítos. Nesta fase, verifica-se uma redução significativa do número total de eritrócitos, concentração de hemoglobina e volume globular, como evidência de uma anemia aplásica severa. A icterícia que se desenvolve resulta não só da destruição das hemácias mas também das lesões provocadas no fígado (Pipano & Shkap, 2004).

O factor de necrose tumoral (TNF)- α é considerado o principal responsável da patogenia da theileriose tropical (Pipano & Shkap, 2004). Preston *et al.* (1993) demonstrou que o TNF- α exerce um papel muito importante e justifica diversos sinais clínicos associados à infecção por *T.annulata*, como hemorragias disseminadas em infecções letais, causando nos bovinos debilidade, acompanhada de depressão, anorexia e caquexia (Forsyth *et al.*, 1999). O TNF- α é produzido espontaneamente pelos macrófagos do hospedeiro, como resultado da exposição a níveis anormalmente elevados de interferon (INF)- γ . Estes níveis de INF- γ ocorrem em infecções letais, induzindo a produção excessiva de TNF- α , e assim contribuindo para o desencadeamento dos sinais clínicos e lesões nos tecidos em bovinos infectados. A produção excessiva de TNF- α está relacionada com o aparecimento da leucopénia, hemorragias disseminadas e lesões ulcerativas (Pipano & Shkap, 2004).

De um modo geral, a patogenia das lesões que ocorrem em órgãos como o fígado, baço, pulmões e rins, não é ainda totalmente compreendida. Tem sido sugerido, que a congestão e edema pulmonar estão relacionados com a linfocitólise das células infectadas, no interior dos pulmões (Pipano & Shkap, 2004). Como consequência da linfocitólise ocorre a libertação de enzimas proteolíticas, coagulação intravascular disseminada (CID), resultante da libertação de produtos de degradação do fibrinogénio (PDF), e, por outro lado, ocorre activação do complemento, que exerce acção sobre as aminas vasoactivas e provoca contracção do músculo liso. Ambos processos conduzem a um aumento de permeabilidade e consequente edema pulmonar. Os animais que conseguem recuperar desenvolvem epiteliação alveolar, formação de membranas hialinas e fibrose, dificultando a função pulmonar (Navarrete *et al.*, 2002).

Segundo Navarrete *et al.* (2002), a acção patogénica dos parasitas do género *Theileria* pode dividir-se em três fases:

1) Fase linfoproliferativa: fase de formação dos esquizontes, que primeiro localizam-se nos linfonodos mais próximos do local de inoculação, levando à hipertrofia destes. O desenvolvimento destas formas parasitárias conduz a uma série de alterações celulares, com formação de grandes células linfoblastóides, originando

divisão celular e parasitária. Como consequência os esquizontes são destruídos e libertam os merozoítos. Nesta fase ocorre panleucopénia, coincidente com o momento em que se detectam os parasitas. No fim desta fase, as células parasitadas podem ser encontradas no timo, placas de Peyer, lâmina própria do aparelho digestivo e tecido intersticial do pulmão.

2) Fase de desorganização e depleção: fase dominada pelos fenómenos de atrofia e necrose linfóide, assim como grande infiltração de linfoblastos infectados no tecido intersticial do pulmão e lâmina própria do aparelho digestivo. É a fase em que ocorre linfocitólise, originando um quadro de edema pulmonar e dispneia grave.

3) Fase hemoproliferativa e hemolítica: ocorre com o aparecimento dos merozoítos, e penetração destes nos eritrócitos. Nesta fase, ocorre linfopoiese e proliferação de linfoblastos, que é intensa em infecções por *T. parva* e moderada no caso de *T. annulata*. Esta fase é bastante importante do ponto de vista clínico, devido à replicação massiva das formas parasitárias no interior dos glóbulos vermelhos (Navarrete *et al.*, 2002).

5. Imunidade

A resposta imunológica do hospedeiro é dirigida contra todos os estados de *Theileria annulata*: esporozoítos, macroesquizonte e merozoítos. A imunidade é mediada essencialmente por células, ao invés, de uma resposta imune humoral (Altug *et al.*, 2008). No entanto, a protecção contra a infecção por *T. annulata* depende da cooperação entre a imunidade inata (independente de células T) e adaptativa (dependente de células T) (Preston *et al.*, 1999).

Está comprovado que ambos mecanismos, dependentes e independentes de anticorpos, estão envolvidos na protecção contra a theileriose tropical. No entanto, os anticorpos apesar de conseguirem neutralizar os esporozoítos, não previnem o início da infecção, visto que, são produzidos numa fase mais tardia (Ahmed *et al.*, 2008). Tem sido demonstrado que os linfócitos T, células T CD4+ e CD8+, desempenham um papel determinante na resposta imunitária contra esta hemoparasitose, especialmente os

linfócitos T CD4+ que produzem citocinas (IL-2 e INF- γ), necessárias para a expansão em clone dos linfócitos T citotóxicos (CD8+) (Razavi *et al.*, 2010).

As células T-citotóxicas e T-helper reconhecem os antígenos parasitários, apresentados pelas células infectadas via complexo maior de histocompatibilidade (MHC) classe I e II, respectivamente. Os linfócitos T helper e citotóxicos respondem à presença de células infectadas: as células T helper proliferam e produzem citocinas, interleucina-2 (IL-2) e interferão- γ (INF- γ). A IL-2 é consumida pelas células T citotóxicas para a expansão do clone e posterior destruição das células que apresentam moléculas pertencentes ao MHC da classe I. No entanto, a imunidade inata também desempenha um papel importante, formando a primeira linha de defesa, constituída pelas barreiras epiteliais, células especializadas e anticorpos presentes nos epitélios. Se o agente etiológico interagir com epitélios e entrar em circulação ou nos tecidos, vai ser atacado por fagócitos, linfócitos especializados designados de “natural killer” (NK) e proteínas, incluindo as do sistema complemento (Ahmed *et al.*, 2008).

O pico de produção de INF- γ ocorre 4 a 9 dias pós-infecção, coincidindo com o aparecimento de um grande número de células infectadas com macroesquizontes e com a fase de maior proliferação de leucócitos nos linfonodos infectados (Campbell *et al.*, 1997). Estas células infectadas induzem a proliferação de linfócitos T “naive”, que por sua vez, vão activar os linfócitos Th1 a produzir grandes quantidades de INF- γ (Ahmed *et al.*, 2008). A proliferação dos linfócitos T “naive” pode ser bloqueada por anti-MHC classe II ou anti-CD4+, mas não por anti-MHC classe I ou anti-CD8+. Campbell *et al.* (1997), sugerem que a activação dos linfócitos T “naive” é mediada por superantígenos, de forma semelhante ao observado em muitas outras infecções virais ou bacterianas (Ahmed & Mehlhorn, 1999).

Os linfonodos regionais, próximos do local da inoculação, sofrem hipertrofia como resultado da expansão das células infectadas e dos linfócitos T. A patologia observada deve-se essencialmente aos níveis anormalmente elevados de INF- γ , juntamente com a produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias. É possível que a IL-2, produzida por células T, contribua para o crescimento de células infectadas

através da ligação aos receptores da IL-2 (IL-2R), de forma parácrina. Assim sendo, a IL-2 e IL-2R, desempenham um papel importante na patogenia da theileriose causada por *T. annulata*, favorecendo o crescimento das células parasitadas (Ahmed *et al.*, 2008).

A inibição da proliferação de células T “não específica” é factor importante no controlo da infecção, permitindo o estabelecimento de uma resposta imune específica e eficaz. Segundo Ahmed *et al.* (2008), os macrófagos e monócitos, apresentam elevada importância na inibição da proliferação destas células. *In vitro*, em cultura de vários linfócitos, células mononucleares do sangue periférico (PMBCs), de animais imunizados, inibiram o crescimento de células infectadas, de forma independente de MHC. No entanto, PMBCs de animais não imunizados não interferem no crescimento das células parasitadas, o que é indicativo que os PMBCs de animais imunizados contêm no seu interior uma população capaz de exercer um efeito citostático sobre o crescimento das células parasitadas. Estas células são designadas de células citostáticas (cytostatic acting cells, CACs) e desempenham várias funções, tais como: induzir a lise de células infectadas, que não conseguem incorporar [³H]-timidina; secretam óxido nítrico que inibe a replicação do parasita e consequente apoptose da célula infectada; produzem TNF- α que inibe a proliferação celular (Ahmed *et al.*, 2008).

Assim sendo, os macrófagos citostáticos podem controlar a infecção através da produção de TNF- α , que inibe a proliferação de células T, e consequentemente, origina a redução da produção de IL-2 e IFN- γ (citoquinas essenciais para o crescimento de células infectadas) (Ahmed & Mehlhorn, 1999).

A função das células NK não é muito clara, embora se pense que estão envolvidas na lise das células parasitadas (figura 4), de maneira independente MHC. Além disso, está bem definido, que estas células produzem IFN- γ para activar os macrófagos não infectados (figura 4). Por sua vez, os macrófagos produzem uma série de citoquinas (IL-1, IL-6 e TNF- α), algumas das quais podem inibir a infecção de outras células (Ahmed *et al.*, 2008).

Existe pouca informação disponível sobre a resposta imune dos bovinos contra os merozoítos intra-eritrocitários. O óxido nítrico pode estar implicado na resposta imune aos merozoítos, uma vez que consegue parar a invasão de macrófagos no

sangue periférico pelos esporozoítos, também pode evitar a invasão dos eritrócitos pelos merozoítos. Por outro lado, o soro imune reage contra os merozoítos “livres”, isolados dos eritrócitos, indicando que o soro de bovinos infectados contém anticorpos com capacidade de opsonizar merozoítos (Ahmed & Mehlhorn, 1999, Preston *et al.*, 1999).

Muitos dos sinais clínicos da infecção por *Theileria annulata* estão associados a actividade de citocinas pró-inflamatórias, sendo que a sua função depende do momento em que são produzidas e do local onde actuam. Em casos agudos de doença podem ser fatais, assim como, podem funcionar como parte protectora da resposta imunitária. As células infectadas expressam mRNA para várias citocinas tais como IL-1 α , IL-1 β , IL-6 e TNF- α (Ahmed *et al.*, 2008). Os níveis de mRNA expressos para a IL-6 e IL-1 α estão directamente relacionados com a quantidade de proliferação induzida em células T activadas (Campbel & Spooner, 1999). Tem sido comprovado, que as linhas celulares que produzem maior quantidade de citocinas pró-inflamatórias induzem maior gravidade à doença, ocorrendo proliferação de células T “aberrantes” e uma abundante produção de IFN- γ . No entanto, o TNF- α e IFN- γ são essenciais para o controlo da infecção, interferindo no processo de diferenciação dos esquizontes e assim previnem novas infecções (Ahmed *et al.*, 2008).

A resposta imunitária contra a infecção por *T. annulata* representa um grande desafio para os investigadores e depende essencialmente de dois factores: 1) a velocidade de resposta da imunidade inata face à entrada de parasitas nas células alvo; 2) a rápida activação da memória das células T CD4+, que induzem os macrófagos a produzir citocinas (inibem a proliferação de células infectadas) e óxido nítrico (induz a apoptose de células infectadas) (Preston *et al.*, 1999).

Resposta imune mediada por anticorpos



Resposta imune mediada por células

a) Resposta específica

CTL-MHC classe I – restringido → Lise de células infectadas

Linfócitos T – helper → Produção de citocinas (IL-2 e INF- γ)

- Activação de macrófagos
- Expansão clonal de CTL
- Produção de anticorpos

b) Resposta não específica

Activação de macrófagos → Inibição da proliferação celular

Células "natural Killer" → Lise de células infectadas

Figura 4 – Possível mecanismo de imunização em infecções por *T. annulata* (adaptado de Ahmed & Mehlhorn, 1999).

6. Sinais Clínicos

O período de incubação em infecções naturais por *Theileria annulata* varia entre 9 e 25 dias (em média 15 dias), enquanto o período pré-patente (aparecimento de merozoítos nos eritrócitos) ocorre entre 12 a 30 dias (em média 17 dias). Em raras ocasiões, o período pré-patente pode alongar-se até 10 meses (Pipano & Shkap, 2004).

Os sinais clínicos mais comuns em animais infectados por *T. annulata* são a perda de peso, anorexia, fraqueza, temperatura corporal elevada/hipertermia, petéquias na mucosa conjuntival, linfadenopatia, anemia e tosse (Hasanpour *et al.*, 2008). No início da infecção, quando se forma um determinado número de macroesquizontes, aparece febre (40-41°C) que permanece constante durante 7-8 dias, adenomegalia dos linfonodos superficiais, aumento do pulso e frequência respiratória (Navarrete *et al.*, 2002, Pipano & Shkap, 2004). A anorexia e diminuição da motilidade do rúmen são precedidas por desidratação e constipação (Pipano & Shkap, 2004). As diarreias hemorrágicas podem ser observadas em fases terminais da doença. Como o protozoário *Theileria annulata* origina a destruição dos eritrócitos, os bovinos afectados apresentam anemia, icterícia e, em alguns casos hemoglobinúria (CFSPH - Center for Food Security and Public Health, 2009). A anemia torna-se progressivamente mais severa com o decorrer da doença, levando à palidez das membranas mucosas (figura 5). A hemoglobinúria que se verifica em alguns casos deve-se à presença de pigmentos de bilirrubina, dando uma cor castanha escura à urina (Pipano & Shkap, 2004).

As petéquias nas membranas mucosas são frequentemente encontradas em casos de theileriose tropical, geralmente indicam um prognóstico desfavorável (CFSPH - Center for Food Security and Public Health, 2009, Pipano & Shkap, 2004). Em raros casos, podem aparecer sinais nervosos (hiperestesia, “head pressing”, convulsões, tremores e reflexo de “pedalar”) em infecções agudas por *T. annulata*, 1 a 3 dias antes da morte do animal (Osman & Al-Gaabary, 2007, Pipano & Shkap, 2004). Casos de abortos também podem ser observados (CFSPH - Center for Food Security and Public Health, 2009).

Outros sinais clínicos também são frequentemente encontrados, tais como corrimento ocular, opacidade da córnea, secreção nasal e dispneia terminal. O animal em estágio terminal da doença, antes da sua morte, geralmente apresenta diminuição da temperatura corporal e dispneia grave devido ao edema pulmonar, sendo frequentemente encontrado corrimento nasal espumoso (Office International des Épizooties, 2009). A anemia e as lesões pulmonares originam taquicardia e dispneia (taquipneia), que com o curso da doença tornam-se mais pronunciadas, levando a um quadro de choque e, conseqüentemente, à morte do animal por insuficiência cardiorrespiratória (Navarrete *et al.*, 2002).

Em infecções prolongadas, podem aparecer lesões de pele, que consistem em petéquias e nódulos na pele, que são produzidos nos tecidos linfóides perivasculares das arteríolas dérmicas (Pipano & Shkap, 2004).

A theileriose tropical pode manifestar-se de forma hiperaguda, aguda, subaguda, crónica e leve (Pipano & Shkap, 2004). A forma hiperaguda ocorre essencialmente em animais altamente susceptíveis introduzidos em áreas endémicas, que desenvolvem febre alta, anorexia, depressão e fraqueza, e morrem em três a quatro dias. Estes animais transportados para áreas endémicas e áreas marginais aos locais onde existem vectores também podem manifestar a doença de forma aguda. Esta é caracterizada pelo aparecimento de febre, que pode persistir por vários dias, acompanhada por inapetência, letargia, adenomegalia dos linfonodos superficiais, secreção óculo-nasal e estase ruminal. Num prazo de poucos dias, os animais vão apresentar anemia, intolerância ao exercício e taquicardia, sendo que, posteriormente, é possível o aparecimento de icterícia e diarreia hemorrágica. Cerca de 90% dos animais com quadro agudo da doença morrem 8 a 18 dias após o início dos sinais clínicos (Taylor *et al.*, 2004).

A forma subaguda da infecção por *T. annulata* é semelhante à aguda, mas os sinais clínicos são menos intensos (Pipano & Shkap, 2004). Ocorre febre intermitente durante duas a quatro semanas, com anemia moderada e icterícia. Alguns bovinos recuperam após um longo período de tempo, no entanto, alguns casos subagudos evoluem para uma fase aguda, levando a morte do animal (Taylor *et al.*, 2004).

Esta hemoparasitose também se manifesta de forma crónica, sobretudo em animais que apresentam outros processos concomitantes (animais debilitados devido à gestação, mal nutridos, com outras infecções bacterianas ou víricas, imunodeprimidos, etc.) (Navarrete *et al.*, 2002). Esta forma é raramente encontrada, visto que, na maioria dos casos a morte ocorre passado duas a três semanas e, com menos frequência após quatro semanas de infecção (Pipano & Shkap, 2004).

A forma leve da infecção por *T. annulata* é encontrada em bovinos que possuem resistência natural, animais protegidos pela imunidade passiva, bovinos vacinados com baixa imunidade, ou quando a estirpe infectante possui baixa virulência. Os sinais clínicos são geralmente despercebidos e o animal recupera espontaneamente (Pipano & Shkap, 2004).

El-Deeb e Younis (2009), estudaram quais os sinais clínicos de um grupo de búfalos (*Bubalus bubalis*) com infecção natural por *Theileria annulata*, mantido em contacto com bovinos. Todos os búfalos afectados apresentavam febre, adenomegalia, palidez das mucosas e anorexia, sendo que alguns também exibiam corrimento ocular, manifestações respiratórias, opacidade da córnea e diminuição da produção de leite. Diarreia, lesões de pele e secreção nasal também foram observadas, mas apenas num pequeno número de animais (El-Deeb & Younis, 2009). Osman e Gaabary-AL (2007), também estudaram o quadro clínico exibido por búfalos infectados, e constataram o aparecimento de sinais clínicos semelhantes, pirexia (40,5-41,5° C), aumento do linfonodos superficiais, descarga nasal e ocular, salivação, anemia, insuficiência respiratória e opacidade da córnea (Osman & Al-Gaabary, 2007).



Figura 5 - Palidez da mucosa vaginal de um bovino adulto com theileriose tropical (foto gentilmente cedida pelo colega André Matado)

Em vitelos com infecções letais pelo protozoário *Theileria annulata*, é comum o aparecimento de lesões nodulares cutâneas multifocais (nódulos subcutâneos com 0,5 a 3 centímetros de diâmetro) (figura 6 - D). Para além dos nódulos, o quadro clínico em vitelos é caracterizado por emagrecimento, anemia, exoftalmia uni ou bilateral (figura 6 - C), petéquias na conjuntiva, mucosa oral e nasal (figura 6 - B). O aumento de tamanho dos linfonodos superficiais (figura 6 - A), especialmente o submandibular e retrofaringeo, e por vezes o prescapular (Branco *et al.*, 2010), assim como, febre, pulso elevado e respiração rápida e superficial, são frequentemente encontrados (Godara *et al.*, 2010).

A taxa de mortalidade associada à theileriose tropical varia entre 20 e 90% nas diferentes áreas geográficas, devido à susceptibilidade dos bovinos afectados e à virulência dos parasitas envolvidos. Os bovinos adultos, que aparentemente recuperaram da infecção, podem morrer duas a três semanas após o desaparecimento dos esquizontes como resultado de complicações, como a disfunção hepática. Os

Theileriose tropical em bovinos de carne na região do Alentejo

Universidade de Évora, 2011

vitelos recuperados é frequente apresentarem atrasos no crescimento (Pipano & Shkap, 2004).



Figura 6 - Sinais clínicos observados em vitelos com theileriose tropical: A) adenomegalia do linfonodo pré-escapular; B) mucosa oral pálida e com petéquias; C) exoftalmia unilateral direita; D) nódulos cutâneos.

7. Alterações Laboratoriais

A análise das alterações nos parâmetros hematológicos e bioquímicos do sangue de animais infectados por *T. annulata* é extremamente importante para uma melhor compreensão da patogenia da doença e gravidade da infecção. Estes parâmetros, são uma ferramenta muito útil para o estabelecimento do diagnóstico e prognóstico, assim como, para a decisão do tratamento e terapia de suporte a utilizar (Ramazan & Ugur, 2006, Sandhu *et al.*, 1998).

As principais alterações hematológicas consistem em anemia severa com o valor de hematócrito muito baixo, anisocitose e presença de granulados basófilos nos eritrócitos (Navarrete *et al.*, 2002, Pipano & Shkap, 2004). Inicialmente observa-se leucopenia, que com o avançar da infecção se converte em leucocitose (mais de 36 000 leucócitos/ml), com a presença frequente de eosinofilia (Navarrete *et al.*, 2002). No entanto, Ramazan e Ugur (2006) observaram redução do número de linfócitos, neutrófilos e eosinófilos nos bovinos infectados por *Theileria annulata* (Ramazan & Ugur, 2006). Omer *et al.* (2002), também obteve os mesmos resultados em bovinos adultos infectados naturalmente pelo mesmo parasita (Omer *et al.*, 2002). Outros autores demonstraram que o número de leucócitos aumenta imediatamente após a infecção e, em seguida, diminui significativamente dentro de alguns dias. A leucopénia é mediada essencialmente pelo factor de necrose tumoral (TNF)- α . Esta diminuição do número de leucócitos está associada à destruição dos linfócitos nos órgãos linfóides e com a infiltração dessas células em vários órgãos (Ramazan & Ugur, 2006).

Ao nível de hemograma, verifica-se uma diminuição do número de eritrócitos (RBCs), do hematócrito (PCV) e de hemoglobina (Hb), que se torna mais acentuada à medida que a parasitemia progride. Esta diminuição do RBC, PCV e Hb, deve-se essencialmente à multiplicação dos piroplasmas nos eritrócitos que origina a lise destas células. Com o aumento da parasitemia, geralmente, observa-se uma elevação do volume corpuscular médio (MCV) e da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), característico de anemia macrocítica hipercromica. A macrocitose, policromasia e presença de grânulos basófilos nos eritrócitos, são indicativos de

Theileriose tropical em bovinos de carne na região do Alentejo

Universidade de Évora, 2011

anemia regenerativa. Esta é caracterizada pela presença de reticulócitos, o que explica que a elevação do MCV e CHCM pode ser devido a hemólise extravascular dos eritrócitos infectados (Nazifi *et al.*, 2009). A reticulocitose, verificada na theileriose tropical, ocorre devido a destruição dos RBCs e, subsequente estímulo da anemia na produção de precursores dos eritrócitos, sendo observada em estágios mais avançados da doença.

A diminuição do tempo de tromboplastina parcial activado (APTT) e o tempo de protrombina (PT) deve-se à redução da síntese hepática e ao aumento do consumo dos factores de coagulação. A trombocitopénia, normalmente observada, deve-se à destruição, consumo e degradação das plaquetas no sangue periférico, e à supressão da libertação por parte da medula óssea. É provável, que as citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 e IL-6) libertadas pelos monócitos e macrófagos infectados, contribuam para a alteração dos factores de coagulação, através da indução da libertação de mediadores da inflamação, tais como a elastase ou os radicais livres de oxigénio (Ramazan & Ugur, 2006).

Na experiência realizada por Navarrete *et al.* (2002), após infectarem bovinos com *Theileria annulata*, observou-se que o valor do hematócrito permaneceu dentro dos limites fisiológicos para bovinos (cerca de 39%) durante os primeiros doze dias após a inoculação. Após este período, começou a diminuir até ter atingido o valor de 24%, coincidindo com o nível máximo de parasitémia. Este facto deve-se ao elevado poder hemolítico do protozoário *T. annulata*. Após a realização do tratamento sintomático (ferro, aminoácidos, vitaminas, protectores hepáticos, etc.), verificou-se a recuperação do valor do hematócrito, que alcançou os valores fisiológicos 38 dias após a inoculação dos esporozoítos (Navarrete *et al.*, 2002).

Na análise dos parâmetros bioquímicos de animais com theileriose tropical, é comum o aumento dos níveis de aspartato aminotransferase (AST), sorbitol desidrogenase, alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (ALP), creatinina-quinase (CK) e γ -glutamil transferase (GGT). Os níveis de bilirrubina, ureia (BUN, “blood urea nitrogen”) e ácido úrico também se encontram elevados com frequência (Pipano & Shkap, 2004).

A AST e ALT são enzimas presentes em elevada concentração no músculo e fígado, estando envolvidas no metabolismo de aminoácidos e hidratos de carbono. A elevação destas enzimas, juntamente com a ALP, é indicativo de necrose ou lesões nesses tecidos. A infecção por *T. annulata* causa lesões do tecido hepático, que incluem a necrose de coagulação, alteração da estrutura dos hepatócitos e grande infiltração de linfócitos nas áreas periportais, indicando a presença de danos no sistema hepatobiliar devido à hipoxia resultante da anemia e icterícia.

A GGT é uma enzima muito sensível em casos de doença hepática, que aparece frequentemente aumentada em animais infectados por *T. annulata*. O aumento da creatinina-quinase (CK) é indicativo de lesão muscular devido à condição anémica do animal e toxémia resultante de decúbito prolongado em fases terminais da doença. O aumento significativo dos níveis de bilirrubina deve-se à destruição dos eritrócitos parasitados por eritrofagocitose, que ocorre no baço, linfonodos e noutros órgãos do sistema reticuloendotelial. O aumento do BUN é indicativo de danos a nível renal, tais como necrose de coagulação, lesões dos túbulos colectores, hemorragias e agregação de linfócitos nos espaços intersticiais (Sandhu *et al.*, 1998). As lesões renais, juntamente com a diminuição da ingestão de alimento, má absorção intestinal e hipoproteinemia, são as causas prováveis da hipocalcémia e hiponatremia. Enquanto, a diminuição da concentração sérica de fósforo (hipofosfatemia) resulta da diarreia e das perdas renais (Hasanpour *et al.*, 2008).

Outras alterações laboratoriais como hemoglobinúria e bilirrubinúria podem estar presentes em alguns casos, associadas quadro de anemia característico da theileriose tropical (Radostits *et al.*, 2002).

8. Lesões Pós-mortem

A severidade das lesões observadas em animais mortos com infecção por *Theileria annulata* depende essencialmente do curso da doença. Em casos fulminantes, em que os animais morrem em poucos dias, as principais lesões limitam-se à hiperplasia dos linfonodos e hemorragias disseminadas (Pipano & Shkap, 2004). Em infecções agudas é comum o aumento de tamanho dos linfonodos, que podem apresenta-se edematosos e hemorrágicos. Enquanto em infecções crónicas, é frequente a diminuição do seu tamanho (CFSPH - Center for Food Security and Public Health, 2009).

Nos típicos casos de theileriose tropical, a carcaça do animal apresenta-se emaciada, anémica e ictérica, com o tecido conjuntivo gelatinoso e de cor amarela. Numerosas petéquias ou hemorragias maiores são observadas no tecido subcutâneo, membranas serosas e mucosas. Os linfonodos superficiais e internos encontram-se aumentados e hemorrágicos, como já foi referido anteriormente. O baço também apresenta aumento do tamanho como resultado da hiperplasia do tecido linfóide, enquanto o fígado, para além da hepatomegalia, encontra-se friável e com uma coloração amarela alaranjada ou castanha, devido à ocorrência de degenerescência parenquimatosa. Por sua vez, a vesícula biliar apresenta-se distendida, contendo bÍlis espessa de cor verde escura. Os rins apresentam congestão, áreas de hemorragia ou pequenos focos vermelho-esbranquiçados derivados da hiperplasia linfóide e, a bexiga contém urina castanho-escura devido a presença de pigmentos biliares (Pipano & Shkap, 2004).

Na cavidade torácica, a principal lesão é o edema agudo do pulmão, que pode muitas vezes ser fatal, juntamente com zonas enfisematosas compensatórias e áreas de petéquias na pleura (Navarrete *et al.*, 2002). Relativamente ao coração, encontram-se petéquias e equimoses no epicárdio e endocárdio (Taylor *et al.*, 2004), e sinais de degenerescência e extensas áreas hemorrágicas no miocárdio (Pipano & Shkap, 2004). Na cavidade torácica e abdominal pode ocorrer acumulação de grandes quantidades

Theileriose tropical em bovinos de carne na região do Alentejo

Universidade de Évora, 2011

de líquido seroso, sendo também, encontrado com frequência na cápsula renal e pericárdio (Navarrete *et al.*, 2002, Pipano & Shkap, 2004).

O tracto gastrointestinal pode apresentar alterações de acordo com a duração do processo infeccioso (Pipano & Shkap, 2004). Observa-se inflamação do aparelho digestivo, em particular, do abomaso, intestino delgado e intestino grosso (Navarrete *et al.*, 2002). Para além da inflamação, o abomaso encontra-se com hiperémia, podendo exibir ulceração hemorrágica na mucosa (Taylor *et al.*, 2004).

Excepcionalmente podem observar-se pápulas ou pústulas na pele (podem ser necróticas ou ulceradas), compostas por infiltrados de neutrófilos e linfócitos, e células infectadas com esquizontes. Assim como, alguns animais, apresentam alterações a nível cerebral, caracterizadas pela presença de coágulos no cérebro e nas meninges, compostos por um grande número de linfócitos (Pipano & Shkap, 2004).

Em animais jovens com theileriose tropical é comum observa-se nódulos brancos (por vezes, hemorrágicos ou com halo hemorrágico) na pele e tecido subcutâneo. Estes nódulos também podem ser encontrados no músculo-esquelético, serosas intestinais, omento, faringe, traqueia, miocárdio, hipófise, timo, entre outros tecidos. Histologicamente, os nódulos são constituídos por células redondas, semelhantes a células linfóides neoplásicas, contendo macresquizontes de *T. annulata* no seu citoplasma (Branco *et al.*, 2010).

Através de citologia por aposição em órgãos como fígado, baço e linfonodos, é possível observar os macrófagos infectados com macroesquizontes, sendo o fígado o órgão de eleição para esta técnica (Pipano & Shkap, 2004).

9. Diagnóstico

Em áreas endémicas de theileriose tropical, os sinais clínicos não específicos como febre, anemia, icterícia e aumento dos linfonodos superficiais, apenas justificam o diagnóstico presuntivo de infecção aguda por *Theileria annulata* (Pipano & Shkap, 2004).

O diagnóstico laboratorial da theileriose tropical tem sido realizado tradicionalmente através da observação microscópica de esfregaços de sangue periférico e/ou punção aspirativa de linfonodos, corados com o método de Giemsa (Manuja *et al.*, 2001). Os métodos serológicos são utilizados com maior frequência na detecção de animais com infecções subclínicas (Dumanli *et al.*, 2005), e para estudos epidemiológicos, com o objectivo de determinar a seroprevalência da doença (Silva *et al.*, 2010).

Outras técnicas de diagnóstico, baseadas na detecção de ADN do parasita, como a reacção de cadeia de polimerase (PCR) e a “reverse line blot” (RLB) conseguem, simultaneamente, detectar e diferenciar a espécie em causa (Silva *et al.*, 2010).

9.1. Diagnóstico Microscópico

Este método de diagnóstico baseia-se na detecção das formas parasitárias por microscopia óptica, através de esfregaços de sangue periférico e/ou punção aspirativa de linfonodos, em bovinos vivos (Almeria *et al.*, 2001). Em animais mortos, durante a necropsia, pode-se efectuar o diagnóstico através de esfregaços por aposição em órgãos como o fígado, baço e linfonodos. Os esfregaços são normalmente corados pelo método de Giemsa (considerado o método de eleição para observação dos parasitas em esfregaços) (Pipano & Shkap, 2004).

Através da observação microscópica dos esfregaços, é possível observar os esquizontes no interior de células mononucleadas (principalmente macrófagos) (figura 7-A) e os merozoítos nos eritrócitos (figura 7-B). Por outro lado, também é comum encontrar esquizontes livres (Pipano & Shkap, 2004).

Os esquizontes são geralmente encontrados em esfregaços de linfonodos, baço e fígado, sendo que a sua presença no sangue periférico durante a fase aguda da infecção é indicativo de um mau prognóstico (CFSPH - Center for Food Security and Public Health, 2009).

Os esquizontes podem ser observados 7 a 28 dias após a infecção, isto é, durante a fase aguda da doença. Enquanto os merozoítos, são detectados no interior dos eritrócitos 1 a 3 dias após o aparecimento dos esquizontes, podendo permanecer no hospedeiro durante vários meses ou anos. No entanto, a detecção de merozoítos em animais portadores, nem sempre é possível através da observação microscópica de esfregaços (Pipano & Shkap, 2004).

Morfologicamente, as formas intra-eritrocitárias de *T. annulata* tendem a ser redondas ou ovais (Taylor *et al.*, 2004). Durante a fase aguda da infecção, a maioria dos merozoítos apresenta dimensões inferiores (1 a 2 μm), quando comparados com as formas observadas em bovinos portadores crónicos (Pipano & Shkap, 2004). Em esfregaços corados por técnicas como o Giemsa, estas formas apresentam citoplasma eosinófilo com um grânulo basófilo de cromatina numa das extremidades, podendo ser observadas isoladamente, aos pares ou em tetradas, formando a “cruz de Malta” (Navarrete *et al.*, 2002).

Por sua vez, os esquizontes observados são multinucleados, redondos e apresentam um diâmetro que pode variar entre 1 e 15 μm . Contêm em média 12 núcleos com 1,5 μm de diâmetro, no entanto, podem ser encontrados esquizontes com mais de 80 núcleos (Pipano & Shkap, 2004).

A detecção microscópica através de esfregaços corados por técnicas como o Giemsa é utilizada principalmente na confirmação do diagnóstico da infecção em fase aguda, ou seja, em bovinos com sintomatologia clínica. Este método de diagnóstico não é considerado apropriado para efectuar estudos epidemiológicos em larga escala, estudos de prevalências e de distribuição geográfica (Silva *et al.*, 2010).

A observação dos parasitas em bovinos portadores crónicos nem sempre é fácil, uma vez que na maioria dos casos o número de parasitas é reduzido, o que pode originar uma elevada percentagem de falsos negativos. Outro problema inerente a

este método é a dificuldade na diferenciação das várias espécies de *Theileria*, baseado apenas em aspectos morfológicos. Este facto pode ser alvo de grande confusão, visto que, é frequente a ocorrência de infecções mistas (Almeria *et al.*, 2001).

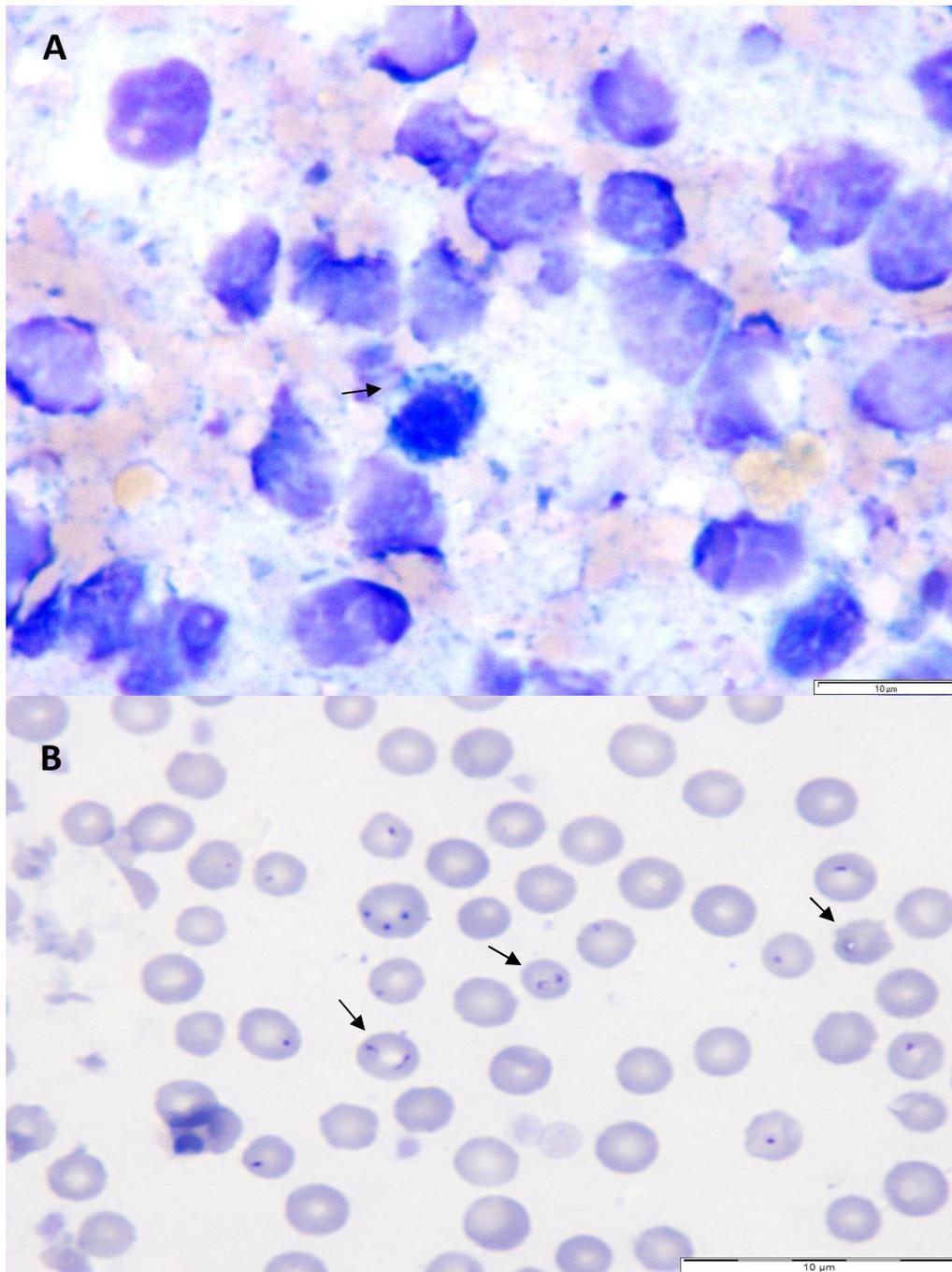


Figura 7 - Diagnóstico microscópico através de esfregaços corados pelo método de Giemsa: A) esquizontes no interior de um macrófago (seta), em esfregaço de baço; B) merozoítos no interior de eritrócitos, em esfregaços de sangue (setas).

9.2. Diagnóstico serológico

Os métodos serológicos de diagnóstico são utilizados para detectar a exposição prévia ao agente etiológico e, portanto, amplamente usados em estudos epidemiológicos com o objectivo de estimar seroprevalências (Silva *et al.*, 2010). São considerados os métodos mais adequados para o diagnóstico de theileriose tropical em fases mais avançadas da doença, assim como, em animais portadores em que o título de anticorpos é geralmente elevado, apesar de não se detectarem piroplasmas por microscopia óptica (Bakheit *et al.*, 2004).

Existem várias provas serológicas que podem ser aplicadas no diagnóstico da infecção por *Theileria annulata*, tais como a hemaglutinação, o teste de fixação do complemento, a prova de precipitação em agar gel, a imuno-electroforese, a aglutinação em tubo capilar, o teste de imunofluorescência indirecta (“indirect fluorescent antibody test”, IFAT) e o teste ELISA (“enzyme-linked immunosorbent assay”, ELISA) (Hashemi-Fesharki *et al.*, 2006).

Em bovinos com infecções latentes o método de diagnóstico serológico mais utilizado é teste de imunofluorescência indirecta (IFAT) (Pipano & Shkap, 2004). No entanto, recentemente, o teste ELISA tem sido amplamente aplicado no diagnóstico serológico desta hemoparasitose e, na avaliação da imunidade em animais vacinados no Irão (Hashemi-Fesharki *et al.*, 2006).

9.2.1. Teste de IFA

O teste de imunofluorescência indirecta (IFAT) permite a detecção de anticorpos séricos em bovinos recuperados de infecções por *Theileria annulata* (Darghouth *et al.*, 1996). É um teste bastante útil na detecção de rebanhos que contenham bovinos portadores crónicos assintomáticos, mas nem sempre é suficientemente sensível para detectar todos os bovinos infectados (Office International des Épizooties, 2008).

Os antigénios utilizados para detecção de anticorpos, podem ser esquizontes ou merozoítos provenientes de animais infectados (Darghouth *et al.*, 1996). Se forem

utilizados esquizontes como antigénio, os anticorpos são detectados pela primeira vez, 10 a 14 dias após a infecção com esporozoítos. No caso de usarmos merozoítos como antigénio, os anticorpos são detectados mais tarde, entre o 15^o e 21^o dia pós-infecção. O período de tempo que os anticorpos permanecem em circulação após a infecção é variável, dependendo de factores como estabelecimento de um estado de portador, se houve ou não intervenção terapêutica e se animal voltou a contactar com o parasita. De um modo geral, o nível máximo de anticorpos detectáveis ocorre 30 a 60 dias após infecção. Estes níveis vão diminuindo progressivamente, mas ainda são detectáveis 4 a 6 meses após a recuperação do animal (Office International des Épizooties, 2008).

Darghouth *et al.* (2004) realizaram uma avaliação do teste de IFA com esquizontes como antigénio, em infecções primárias por *T. annulata* em vitelos e obtiveram uma sensibilidade de 88,9% e especificidade de 97% (Gharbi *et al.*, 2006). Em outro estudo, envolvendo bovinos adultos e vitelos, utilizaram-se piroplasmas como antigénio, verificando-se uma menor sensibilidade (86,4%) e especificidade (44%) do IFAT (Omer *et al.*, 2011). Assim sendo, a utilização de esquizontes como antigénio, apresenta maior fiabilidade comparativamente com a utilização de merozoítos (Darghouth *et al.*, 1996).

A principal desvantagem desta técnica é o facto de os resultados do IFAT basearem-se na observação subjectiva do grau de fluorescência (Omer *et al.*, 2011). Outra grande limitação do IFAT é a possibilidade de ocorrência de reactividade cruzada com outras espécies do género *Theileria* (Gubbels *et al.*, 2000). Esta limitação da técnica de IFA (“indirect fluorescent antibody”) conduz a uma redução da sua especificidade em locais onde co-existem várias espécies. Apesar de a *T. annulata* apresentar reactividade cruzada com a *Theileria parva*, tem pouco significado prático, uma vez que a distribuição geográfica destas duas espécies é diferente (Office International des Épizooties, 2008).

9.2.2. Teste de ELISA

Testes serológicos baseados em ensaios imunoenzimáticos (ELISA) são cada vez mais utilizados na detecção de anticorpos específicos de parasitas do género *Theileria*

Theileriose tropical em bovinos de carne na região do Alentejo

Universidade de Évora, 2011

(Office International des Épizooties, 2008). O recurso ao teste ELISA é feito não só no diagnóstico de animais doentes, como também, na avaliação da imunidade em animais vacinados (Hashemi-Fesharki *et al.*, 2006). Estes testes têm a capacidade de detectar anticorpos por um longo período de tempo, superior ao teste de IFA (Office International des Épizooties, 2008). Além disso os ELISA são mais fáceis de executar (logo menos erros do operador), menos subjectivos quanto à avaliação, conseguem processar um grande número de amostras num curto espaço de tempo e, o uso de antigénios específicos reduz a probabilidade de reacções cruzadas (Hashemi-Fesharki *et al.*, 2006, Mohammad Al-Saeed *et al.*, 2010).

O ELISA baseado na detecção de anticorpos, apresenta maior sensibilidade e especificidade do que o teste de IFA. Hashemi-Fesharki *et al.* (2006) demonstraram este facto ao compararem os dois testes na detecção de anticorpos em 116 bovinos vacinados contra a theileriose tropical. Das 116 amostras de soro, 94 foram positivas ao ELISA e apenas 86 soros mostraram títulos de anticorpos positivos ao IFAT. Concluíram então, que a sensibilidade e a especificidade do teste ELISA em comparação com o IFAT foi de 95,5% e 66,6%, respectivamente (Hashemi-Fesharki *et al.*, 2006). No entanto, o ELISA indirecto, baseado na detecção do antigénio imunodominante da proteína de superfície da *Theileria annulata* (TaSP), tem revelado maior sensibilidade (99,1%) e especificidade em comparação ao teste de IFA, em estudos epidemiológicos da theileriose tropical. Contudo, verificou-se a existência de algumas reacções cruzadas com soros de animais infectados experimentalmente com *T. parva* e *Trypanosoma*, sendo necessário desenvolver o teste ELISA competitivo para melhorar a especificidade. O ELISA competitivo (cELISA) baseia-se na detecção de anticorpos circulantes contra a TaSP (Renneker *et al.*, 2009). Resumidamente, estes autores desenvolveram um cELISA utilizando antigénios recombinantes TaSP e um anticorpo monoclonal (1C7), que se liga especificamente à TaSP. Em comparação com o ELISA indirecto, a sensibilidade e a especificidade do cELISA foi menor (84,2%, e 52,4%, respectivamente). Estes resultados obtidos podem dever-se ao facto do ELISA indirecto ter detectado falsos positivos (devido à reactividade cruzada). Por outro lado, e em relação ao cELISA, apenas um epítipo do antigénio TaSP se liga ao anticorpo

monoclonal, no entanto, o antigénio TaSP como é polimórfico pode não ter detectado alguma estirpe, resultando em falsos negativos. Apesar disto, o cELISA provou ser uma técnica adequada para aplicar a campo, tendo capacidade para monitorizar a prevalência da infecção por *T. annulata* e identificar portadores assintomáticos (Renneker *et al.*, 2009).

Num estudo realizado, compararam a técnica do ELISA utilizando apenas uma diluição e várias diluições, para detecção de anticorpos contra *T. annulata*. Observou-se que o ELISA com uma única diluição foi altamente económico, fácil de executar, conseguindo-se processar um grande número de amostras em pouco tempo, em comparação com a utilização de várias diluições. Assim sendo, o ELISA com uma diluição constitui uma opção válida para utilizar em estudos epidemiológicos no campo (Manuja *et al.*, 2001).

Os testes ELISA são considerados adequados para estudos epidemiológicos em larga escala e monitorização, visto que, são bastante económicos, fiáveis e fáceis de padronizar. Para além disso, o ELISA é uma técnica bastante fiável para detectar bovinos portadores a longo prazo, uma vez que a detecção de anticorpos não depende da presença do parasita (Renneker *et al.*, 2009).

9.3. Diagnóstico Molecular

Os bovinos portadores podem não ser detectados por métodos serológicos, uma vez que os anticorpos em animais portadores tendem a desaparecer a longo prazo, mas os piroplasmas persistem e são infectantes para os vectores ixodídeos (d'Oliveira *et al.*, 1995). Deste modo, é necessário recorrer a técnicas de diagnóstico molecular, que possuem maior sensibilidade e especificidade do que o exame microscópico de esfregaços e os métodos serológicos (Garcia-Sanmartin *et al.*, 2006).

9.3.1. Reacção de Cadeia de Polimerase (PCR)

A reacção de cadeia de polimerase (PCR) é uma técnica de biologia molecular baseada na amplificação de fragmentos de ADN (ácido desoxirribonucleico) e sua

Theileriose tropical em bovinos de carne na região do Alentejo

Universidade de Évora, 2011

detecção por electroforese em gel de agarose (d'Oliveira *et al.*, 1995). Normalmente, a pesquisa e identificação de fragmentos de ADN de *T. annulata* é realizada em amostras de sangue total, no entanto, também se pode usar o PCR para detectar o parasita em vectores do género *Hyalomma* (Pipano & Shkap, 2004). O primeiro PCR realizada para diagnóstico de bovinos com theileriose tropical foi baseada no gene Tams1 (antígeno da superfície dos merozoítos de *Theileria annulata*) (Altay *et al.*, 2007, Mohammad Al-Saeed *et al.*, 2010). Actualmente, os *primers* específicos da espécie *T. annulata*, utilizados na reacção de cadeia de polimerase para diagnóstico da infecção são baseados no mesmo gene Tams1 da superfície dos merozoítos (Mohammad Al-Saeed *et al.*, 2010).

Esta técnica de diagnóstico tem a capacidade de amplificar pequenas quantidades de ADN do parasita um milhão de vezes, pelo que a sensibilidade do teste é bastante elevada (Office International des Épizooties, 2008). Permite identificar o género e a espécie do parasita, conseguindo diferenciar a *T. annulata* de outras espécies não patogénicas (no caso de infecções mistas) (Almeria *et al.*, 2001). Além disso, tem capacidade de detectar a presença de piroplasmas em animais portadores com baixos níveis de parasitémia (até 0,000048% de parasitémia) (Almeria *et al.*, 2001, d'Oliveira *et al.*, 1995). Devido à sua elevada sensibilidade e especificidade, o PCR é uma técnica bastante recomendada para diagnóstico de casos crónicos e para fins taxonómicos (Habela *et al.*, 1999).

Num estudo epidemiológico realizado em Espanha (região da Estremadura), identificou-se a presença de *Theileria annulata* pela técnica de PCR (75%), observação microscópica de esfregaços de sangue (22%) e IFAT (40%), confirmando-se assim, a elevada especificidade e sensibilidade do método de PCR em comparação com os outros métodos (Habela *et al.*, 1999). Noutro estudo efectuado, pretendia-se detectar os protozoários *T. annulata* e *Babesia bovis*, verificou-se então que 21% (21/100) das amostras foram positivas ao exame de esfregaço de sangue, enquanto o teste de PCR detectou 60% (60/100) das amostras positivas. Das amostras positivas à observação microscópica de esfregaço de sangue, 66,6% (14/21) foram positivas para theileriose e 42,8% (9/21) para Babesiose, enquanto no método de PCR, 60% (36/60) foram

positivas para *T. annulata* e 33,33% (20/60) para *B. bovis*. Algumas das amostras positivas no diagnóstico por PCR não foram detectadas no exame microscópico, possivelmente devido a baixos níveis de parasitemia. Tal como no estudo anterior, registou-se uma maior sensibilidade e especificidade do PCR em comparação com a observação microscópica de esfregaço de sangue (Durrani & Kamal, 2008).

9.3.2. “Reverse Line Blot” (RLB)

Apesar de existirem testes PCR específicos para diferentes espécies de *Theileria* e outros hemoparasitas, geralmente o PCR não detecta infecções mistas. Em muitos casos estes parasitas estão presentes simultaneamente no mesmo animal, daí a necessidade de recorrer à técnica de RLB, que permite simultaneamente detectar e diferenciar espécies de protozoários e rickettsias presentes em animais portadores (Gubbels *et al.*, 1999, Nagore *et al.*, 2004). Esta técnica consiste na hibridização dos produtos resultantes da PCR, através de oligonucleótidos específicos para as espécies, imobilizados numa membrana.

O RLB foi inicialmente desenvolvido para identificar os serótipos da bactéria *Streptococci* e, posteriormente, aplicado na diferenciação do *Mycobacterium tuberculosis*. Foi utilizado por Gubbels *et al.* (1999), com grande sucesso na detecção e diferenciação das diferentes espécies de *Theileria* e *Babesia*. Deste modo, a técnica de RLB é recomendada para estudos epidemiológicos de doenças transmitidas por carraças, devido à sua elevada versatilidade na detecção de todos os protozoários dos bovinos transmitidos por ixodídeos (Gubbels *et al.*, 1999).

Em Portugal, a técnica foi utilizada para caracterizar a população de hemoparasitas do género *Theileria* presentes em bovinos de raça Mirandesa, tendo sido identificada a espécie *T. buffeli* (Brigido *et al.*, 2004). Recentemente, Silva *et al.* (2010), também utilizaram o RLB para detectar e diferenciar as espécies de *Theileria* e *Babesia*, presentes no centro e sul de Portugal (Silva *et al.*, 2010).

García-Sanmartín *et al.* (2006) utilizaram o método de RLB juntamente com exame microscópico de esfregaços, para detecção de *Theileria* spp. e *Babesia* spp.. Foram detectadas 54% de amostras positivas pela técnica de RLB e 28% através da

observação microscópica, sendo que o RLB detectou a presença de piroplasmas em 72 amostras que foram negativas à observação microscópica. Apesar da maior sensibilidade, a técnica de RLB considerou 10 amostras negativas, as quais, foram identificadas como positivas ao microscópio. Este facto não apresenta grande relevância, visto que, pode dever-se à interpretação subjectiva na observação microscópica ou a má condição das amostras (por exemplo, hemolisadas ou com coágulos) (Garcia-Sanmartin *et al.*, 2006).

Com a aplicação desta técnica, não é necessário aplicar PCR a cada uma das espécies de parasitas, uma vez que a técnica de RLB é baseada na amplificação por PCR de espécies correlacionadas (ex: *Theileria/Babesia*). Esta apresenta uma sensibilidade mil vezes superior à técnica de PCR, visto que, associa a amplificação por PCR com a hibridização (Almeria *et al.*, 2009). Outra grande vantagem deste teste é o facto da membrana de oligonucleótidos espécie-específicos poder ser usada pelo menos 20 vezes, tornando-se mais económico (Gubbels *et al.*, 1999).

Deste modo, a técnica de RLB devido à sua elevada sensibilidade e especificidade tem a capacidade de identificar claramente o parasita e detectar portadores crónicos assintomáticos, sendo assim, uma técnica essencial para estabelecer boas medidas de controlo e evitar tratamentos desnecessários (Garcia-Sanmartin *et al.*, 2006).

10. Diagnósticos Diferenciais

Os diagnósticos diferenciais de theileriose tropical deveram ser estabelecidos em relação à Anaplasmosse, Babesiose, Tripanossomose, Febre Catarral Maligna, pleuropneumonia contagiosa bovina, “heartwater” e com outras espécie do género *Theileria* (Office International des Épizooties, 2009).

Em Portugal, mais especificamente nas regiões do Ribatejo e Alentejo, as doenças transmitidas por carraças a ter atenção aquando do diagnóstico de theileriose Mediterrânica/Tropical, são a Anaplasmosse (causada por *Anaplasma marginale*) e Babesiose (causada por *Babesia bigemina* e *B. bovis*). Além disso, deve-se ter em conta outras espécies de *Theileria* identificadas em Portugal, como as pertencentes ao grupo

T. bufeli/orientalis, podendo ocorrer em associação com *T. annulata* (Brigido *et al.*, 2004).

Outros diagnósticos diferenciais a ter em conta são a leucose bovina e a leucose bovina esporádica (etiologia desconhecida, afecta animais com menos 6 meses), especialmente em vitelos, devido a presença de nódulos cutâneos e subcutâneos por todo o corpo do animal e também em órgãos internos (Branco *et al.*, 2010).

11. Prognóstico

O prognóstico das infecções por *Theileria annulata* é muito variável, dependendo da raça dos bovinos (se são autóctones de zonas endémicas ou de raças exóticas importadas), da idade, estado hígio-sanitário e nutricional do hospedeiro, da estirpe e quantidade de esporozoítos inoculados pelos vectores (Navarrete *et al.*, 2002, Pipano & Shkap, 2004).

De um modo geral, o prognóstico é grave, podendo ocorrer a morte do animal em 3 a 20 dias após a infecção (Navarrete *et al.*, 2002). Os animais que recuperam desenvolvem imunidade importante contra o parasita, adquirindo um estado de portadores persistentes (Pipano & Shkap, 2004).

O prognóstico é mais favorável sempre que se actue nas primeiras fases da doença, utilizando fármacos adequados ao agente etiológico e mediante o tratamento sintomático (Navarrete *et al.*, 2002).

12. Tratamento

A theileriose tropical pode ser controlada através da utilização de fármacos com longa acção, como a oxitetraciclina, lactato de halofuginona, buparvaquona e parvaquona (Shkap *et al.*, 2010). A administração de duas doses de oxitetraciclina de longa acção (20 mg/kg) com 48 horas de intervalo, em simultâneo com a infecção ou no início do período pré-patente, previne a morte do animal. No entanto, não há

Theileriose tropical em bovinos de carne na região do Alentejo

Universidade de Évora, 2011

registo de nenhum efeito terapêutico da oxitetraciclina quando administrada durante a fase aguda da infecção (Pipano & Shkap, 2004).

A clorotetraciclina foi o primeiro fármaco utilizado, sobretudo em infecções por *T. parva*, mostrando alguma eficácia contra os esquizontes nos leucócitos. Efeito semelhante ocorre com a utilização de diaminazina (Bernil®), que apresenta actividade apenas nos primeiros estados do parasita. A sua utilização continua a ser indicada em casos de infecções mistas por *Anaplasma e Babesia* ou quando ocorrem infecções bacterianas (Navarrete *et al.*, 2002).

Em 1975, foi descoberto na China o fosfato de Primaquino, que apresentava elevada eficácia na eliminação dos gametócitos de *Theileria annulata*. Este fármaco era administrado por via oral, misturado em água, na dose de 0,75 mg/kg de peso corporal. O qual, apresentava elevada eficácia e segurança, tendo sido utilizado em toda a China (Zhang, 1997).

O coccidiostático halofuginona apresenta eficácia contra as espécies de *T. parva e T. annulata, in vitro*. O seu uso *in vivo*, em bovinos com theileriose tropical está limitado, uma vez que a dose terapêutica está muito próxima da dose tóxica, produzindo efeitos colaterais (de gravidade variável) no tracto gastrointestinal (Pipano & Shkap, 2004, Shkap *et al.*, 2010).

Actualmente, as naftoquinonas (parvaquona e a buparvaquona) são as substâncias activas que oferecem maior eficácia como agentes antitheilerianos específicos (Navarrete *et al.*, 2002). A buparvaquona (Butalex®) é considerada a droga de eleição em casos de theileriose tropical, apresentando actividade eficaz contra os estágios de esquizonte e merozoíto (Shkap *et al.*, 2010). Estes compostos activos têm a capacidade de destruir os leucócitos parasitados, uma vez que apresentam actividade face aos esquizontes (Navarrete *et al.*, 2002).

A dose recomendada de buparvaquona é de 2,5 mg/kg de peso vivo (Radostits *et al.*, 2002), enquanto de parvaquona, é 10 mg/kg de peso vivo, por via intramuscular (Shkap *et al.*, 2010). Devem ser utilizados em dose única ou dupla (casos mais graves), com intervalo de 48 horas (Navarrete *et al.*, 2002). A buparvaquona também pode ser utilizada profilaticamente, utilizando-se uma dose de 5 mg/kg de peso vivo, poucos

Theileriose tropical em bovinos de carne na região do Alentejo

Universidade de Évora, 2011

dias antes da infecção. Esta administração não interfere com o desenvolvimento da imunidade em casos de infecções letais (Pipano & Shkap, 2004).

Em estudos experimentais, uma dose de buparvaquona (2,5 mg/kg) administrada em simultâneo com a inoculação dos esporozoítos ou durante a fase aguda da doença, verifica-se uma diminuição considerável dos sinais clínicos, para além de prevenir a morte do animal. Contudo, em vitelos com theileriose tropical, deve-se administrar drogas que estimulem a hematopoiese em associação com a buparvaquona, de modo a evitar os graves efeitos da severa anemia (Pipano & Shkap, 2004). A taxa de recuperação em bovinos tratados com as naftoquinonas varia entre 80 e 94% (Navarrete *et al.*, 2002).

Apesar de serem os fármacos mais utilizados em infecções por *T. annulata*, não conseguem destruir o parasita por completo, sendo que o animal adquire o estado de portador inaparente (Navarrete *et al.*, 2002).

A principal desvantagem destes fármacos é o seu elevado preço, tornando-se inacessíveis aos pequenos produtores (Shkap *et al.*, 2010). Para além disso, Mhadhbi *et al.* (2010), demonstraram a existência de resistências ao tratamento da theileriose tropical com buparvaquona. Das sete vacas tratadas, quatro morreram apesar das administrações sucessivas com buparvaquona (2,5 e 5 mg/kg peso vivo), enquanto as outras três não apresentaram melhoria, verificando-se uma diminuição no hematócrito, persistência da febre e aumento da parasitemia, após o tratamento. Posteriormente, infectaram experimentalmente três bezerros, e as observações clínicas após o tratamento com buparvaquona, mostraram a ausência da eficácia usual deste fármaco em infecções por *Theileria annulata* (tais como a rápida diminuição do índice de parasitemia e uma rápida recuperação) (Mhadhbi *et al.*, 2010).

Recentemente foi testada a associação de parvaquona com o diurético furosemida (Fruvexon®) no tratamento da theileriose tropical. Esta associação apresenta grande eficácia no tratamento de infecções por *Theileria parva*, com taxa de cura de 89%. Relativamente aos animais tratados com Fruvexon® contra infecção experimental por *Theileria annulata*, não se verificou a redução da severidade da infecção. Deste modo, a buparvaquona continua a ser a substância activa com maior

Theileriose tropical em bovinos de carne na região do Alentejo

Universidade de Évora, 2011

eficácia ao nível das infecções por *T. annulata* (Shkap *et al.*, 2010), apresentando uma taxa de recuperação de 88,7%, enquanto no caso da parvaquona é de 60,7% (Mirzaei, 2007).

A parvaquona e a buparvaquona são drogas químicas que se infiltram nos músculos dos bovinos, constituído um risco para a saúde pública se o leite ou carne de animais tratados for consumido por seres humanos. Uma alternativa ao uso das naftoquinonas é o extracto de *Peganum harmala*, planta rica em alcalóides, oriunda da Ásia Central. Uma vez que se trata de uma droga natural, não constitui perigo para a saúde pública, visto que, não ocorre retenção ao nível dos músculos dos bovinos (Mirzaei, 2007).

Ao testar a actividade do extracto de *Peganum harmala* no tratamento de bovinos naturalmente infectados pelo protozoário *Theileria annulata*, verificou-se que a planta apresenta actividade anti-*theileria*. Cinquenta bovinos de diferentes idades e raças foram tratados com uma administração de extracto de *P.harmala* na dose de 5 mg/kg de peso vivo, por via intramuscular, durante 5 dias consecutivos. Os bovinos tratados foram considerados curados quando a temperatura corporal atingiu valores normais e quando não se detectou esquizontes por um período de 3 dias consecutivos. Obteve-se uma taxa de recuperação de 78 %, ou seja, trinta e nove dos cinquenta bovinos infectados responderam ao tratamento. Neste estudo não foram efectuados tratamentos adicionais, o que pode explicar a menor taxa de cura em comparação com outros trabalhos. No entanto, há que ter em conta a grande importância que os tratamentos de suporte apresentam, essencialmente na prevenção e redução de lesões renais e hepáticas, produzidas pelo metabolismo dos parasitas (Mirzaei, 2007).

Apesar da grande diversidade de alcalóides (harmina, harmalina, harmalol, harman, vasicina e vasicinon) encontrados na planta e do mecanismo pelo qual o extracto de *P. harmala* actua ainda ser desconhecido, suspeita-se que o alcalóide presente neste extracto com maior actividade contra *Theileria annulata*, é a harmalina. (Mirzaei, 2007).

13. Controlo

Como na maioria das doenças transmitidas por ixodídeos, o controlo da theileriose tropical é realizado essencialmente através de medidas de manejo, controlo de vectores, quimioterapia, imunização e criação de raças resistentes. As medidas de manejo tem por objectivo uma boa gestão da exploração, quer seja constituída por animais susceptíveis, resistentes ou imunes, de modo a tentar reduzir o contacto de animais susceptíveis com a doença (Brown, 1990). Deve-se realizar rotação de pastagens de modo a garantir que estas estejam livres de vectores do género *Hyalomma*, uma vez que a limpeza e desinfecção dos locais onde os animais se encontram, não é suficiente para a prevenção da doença (Almeria *et al.*, 2009). Deste modo, o controlo do movimento dos animais é a medida de manejo mais importante no combate da theileriose tropical (Brown, 1990).

Como foi referido no tema anterior, as naptoquinonas (parvaquona e buparvaquona) e as tetraciclinas apresentam efeito profilático, quando administradas em determinadas alturas e em doses adequadas (Pipano & Shkap, 2004). Outro factor importante no controlo desta hemoparasitose é a resistência dos bovinos hospedeiros. Nas diferentes áreas geográficas, onde ocorre theileriose tropical, as raças autóctones apresentam elevada resistência aos efeitos da infecção por *Theileria annulata* e seus vectores, devido à combinação da resistência genética, com a imunidade passiva e adquirida. O grande problema reside na baixa produtividade apresentada pelas raças autóctones, havendo necessidade de importar raças exóticas ou realizar cruzamentos com estas raças. Qualquer destas opções conduz a um aumento da susceptibilidade à infecção. A longo prazo, em algumas regiões endémicas, é boa prática optar pela selecção de bovinos altamente produtivos dentro das populações de animais autóctones ou, por selecção de animais provenientes de cruzamentos, que apresentem resistência à infecção e alta produtividade (Brown, 1990).

O controlo dos vectores ixodídeos depende da aplicação de acaricidas (Brown, 1990). Para além da desta aplicação aos bovinos, é recomendada também aplicação no chão dos parques onde os animais se encontram estabulados e nos locais de

Theileriose tropical em bovinos de carne na região do Alentejo

Universidade de Évora, 2011

armazenamento de alimento (palha e feno), após a lavagem e remoção do lixo/esterco. Na aplicação do acaricida é preciso ter em consideração a actividade residual da substância activa e, o curto período necessário para a maturação dos esporozoítos de *T. annulata*, em carraças fixadas ao hospedeiro (Pipano & Shkap, 2004).

Na prática, o controlo de vectores permanece globalmente limitado devido a vários motivos, tais como os elevados custos de implementação, desenvolvimento de resistências por parte dos ixodídeos e o aparecimento de diferentes espécies de vectores em regiões endémicas (Almeria *et al.*, 2009, Darghouth, 2008). Neste sentido, a utilização de vacinas vivas atenuadas contra a theileriose tropical constitui uma opção de controlo muito atractivo (Darghouth, 2008), sendo a vacinação de bovinos susceptíveis a principal forma de diminuir as perdas produtivas associadas à doença (Pipano & Shkap, 2004).

Em 1930, no Norte de África, as vacinas eram produzidas a partir de sangue colhido de animais com infecções agudas por *Theileria annulata*, com estirpes de baixa virulência produzidas através de passagens sucessivas em bovinos. Este procedimento resultou na perda da capacidade do parasita em produzir merozoítos intraeritrocitários, mas não ocorreu alteração na sua virulência. Uma vacina semelhante foi utilizada em Israel em 1940 e 1950. Neste caso, os bovinos foram inicialmente inoculados com estirpes exóticas de baixa virulência e, dois meses depois foram reinoculados com uma estirpe local (de Israel), com o objectivo de reforçar a imunidade produzida na primeira inoculação. No entanto, durante a década de 1960, foi desenvolvida uma vacina derivada de cultura de células, que é utilizada actualmente. Para produção destas vacinas é necessária uma cultura de esquizontes, iniciada a partir de células com esquizontes provenientes de animais infectados, ou através da infecção *in vitro* de leucócitos de bovinos, com esporozoítos. O crescimento e as várias passagens em cultura conduzem à atenuação da virulência dos esquizontes, que em alguns casos pode demorar entre três meses a três anos. De um modo geral, a primeira cultura de esquizontes tem a capacidade de provocar doença grave e eventualmente a morte, quando inoculada em bovinos susceptíveis. Após várias

semanas ou meses de cultura (duas passagens por semana), observa-se diminuição das manifestações clínicas em animais inoculados. As vacinas de culturas de esquizontes são consideradas completamente atenuadas quando ao inocular um animal, não se observa sinais clínicos, nem a presença de esquizontes ou merozoítos em esfregaços de sangue e tecidos (Pipano & Shkap, 2004).

A imunidade induzida por estas vacinas vivas atenuadas é dirigida essencialmente ao estágio de esquizonte do parasita. Tem sido demonstrado o envolvimento de diferentes mecanismos imunes em bovinos vacinados, tais como, células T citotóxicas, macrófagos citostáticos e óxido nítrico produzido pelos macrófagos activados (Darghouth *et al.*, 2006). Em animais inoculados ocorre a produção de uma quantidade substancial de anticorpos específica, que podem ser detectados serologicamente, mas que não são necessariamente protectores. Há indícios de um certo nível de multiplicação dos esquizontes atenuados em animais inoculados, uma vez que, a inoculação de esquizontes mortos em bovinos, não produz os mesmos níveis séricos de anticorpos (Pipano & Shkap, 2004).

A vacina de esquizontes, produzidas pela infecção *in vitro* de leucócitos com esporozoítos provenientes de carraças, quando inoculadas em bovinos, observa-se moderada ou ausentes manifestações clínicas, sendo que estes animais apresentam imunidade pelo menos durante três anos e meio. Estas vacinas induzem imunidade eficaz contra a infecção transmitida a campo, tanto em bovinos susceptíveis de raças autóctones, como em bovinos de raças exóticas introduzidos em regiões endémicas. No entanto, observou-se que alguns animais vacinados sofreram graves infecções por *T. annulata*, quatro ou mais anos após a vacinação. Este facto permite concluir que a imunidade adquirida após uma única inoculação não tem uma longa duração, assim sendo, a revacinação pode ser necessária em rebanhos com baixas taxas de infestação de ixodídeos (Pipano & Shkap, 2004).

Uma das principais limitações do uso de vacinas vivas atenuadas contra *T. annulata*, é o facto destas vacinas possuírem um curto tempo de vida a 4⁰C, sendo por isso necessário o seu armazenamento em azoto líquido para prolongar o seu tempo de vida (mínimo 2 anos). Esta necessidade de conservação conduz ao aumento do preço

Theileriose tropical em bovinos de carne na região do Alentejo

Universidade de Évora, 2011

das vacinas, complicações técnicas na sua utilização e dificuldade de armazenamento para o veterinário de campo (Darghouth, 2008, Pipano & Shkap, 2004).

Tem vindo a ser desenvolvidas vacinas de subunidades, baseadas em antígenos da superfície dos esporozoítos (SPAG-1) ou do estágio de merozoíto. Em ensaios realizados em bezerros, verificou-se que o antígeno SPAG-1 originava protecção parcial, provavelmente através da redução do número de esporozoítos e da sua capacidade para invadir as células alvo do hospedeiro. Quando comparado com vacinas de células atenuadas, o SPAG-1 fornece protecção limitada. Por outro lado, a combinação do SPAG-1 com a vacina de células atenuadas realizadas em alguns ensaios, induz uma boa e reforçada protecção dos bezerros vacinados.

Tem sido sugerido, que a proliferação do parasita *T. annulata* é controlada em animais imunes por uma rápida expressão de imunidade não específica, associada às células de memória CD4+, que induzem a activação dos macrófagos (muito importantes na resposta imune). Por sua vez, os linfócitos T controlam a infecção através da destruição das células infectadas, que escaparam aos macrófagos. É possível que as vacinas de culturas celulares administradas antes da imunização com SPAG-1 alterem o perfil de citocinas, tornando a resposta imune mais eficaz. Deste modo, é necessária a inclusão de esquizontes e antígenos de esporozoítos no desenvolvimento de uma vacina de subunidades eficaz (Darghouth *et al.*, 2006).

Em alguns países problemáticos (Irão, Egipto e Israel), foi utilizado um método de prevenção baseado na inoculação de macerados de ixodídeos com esporozoítos e posterior tratamento com theilericidas específicos (parvaquona, buparvaquona e halofuginona), permitindo uma melhoria significativa na produtividade. Apesar de algum êxito profilático, este método apresenta inconvenientes, como o desenvolvimento de portadores crónicos inaparentes e a possibilidade de introduzir novas estirpes, caso não se inocule estirpes autóctones (Navarrete *et al.*, 2002).

A imunização com vacinas vivas atenuadas constitui apenas um meio de prevenção, e não, o meio para erradicação da theileriose tropical, visto que, mesmo vacinados, os animais continuam portadores de piroplasmas. Devido à dinâmica dos animais e à contra indicação da vacinação de fêmeas com gestações muito avançadas

Theileriose tropical em bovinos de carne na região do Alentejo

Universidade de Évora, 2011

e de bovinos doentes, a redução da incidência de casos de doença após vacinação anual não vai ser tão significativa, como em ensaios de campo bem controlados. Por outro lado, para um rigoroso controlo da doença, seria necessária a vacinação da população total de bovinos em risco. Por estas razões, outras opções visando o controlo de vectores, são também necessárias implementar, de modo a obter uma boa prevenção (Darghouth, 2008).

II- Seroprevalência e Distribuição Geográfica de theileriose Tropical Bovina no Alentejo

1. Introdução

Este estudo foi realizado com o objectivo de investigar a seroprevalência da theileriose tropical em bovinos de aptidão “carnea” na região do Alentejo. A escolha do tema surgiu após a observação de quatro casos de theileriose tropical em vitelos, durante o estágio de domínio fundamental realizado na Vet+ Serviços Veterinários Lda, que decorreu entre 1 de Novembro de 2010 a 31 de Março de 2011. Além disso, o facto de o Alentejo ser considerada uma região endémica de theileriose e poucos estudos terem sido realizados sobre esta hemoparasitose, associado à ausência de fármacos eficazes em Portugal para o tratamento e prevenção, acrescentaram interesse ao tema.

Os quatro vitelos apresentavam quadros agudos de infecção por *T. annulata*, com sinais clínicos e lesões idênticas. Os sinais clínicos mais comuns foram a apatia, ataxia, mucosas anémicas e com petéquias (essencialmente a mucosa oral e nasal) (figura 8), hipertrofia dos linfonodos pré-escapulares e exoftalmia, que normalmente era unilateral. Também foi detectado em todos os vitelos a presença de nódulos cutâneos e subcutâneos, disseminados por todo o corpo do animal. Em todos os casos, o diagnóstico foi feito com recurso ao exame microscópico, através de esfregaços de sangue e de material recolhido por punção aspirativa com agulha fina dos nódulos, corados pelo método de Giemsa, onde se observaram formas intraeritrocitárias de *Theileria annulata* e esquizontes do mesmo agente.

A terapêutica instituída aos quatro casos clínicos foi idêntica, tendo sido administrado 2,5 mg/kg de buparvaquona por via intramuscular, 20 mg/kg de oxitetraciclina por via intramuscular e, em dois casos, os vitelos foram desparasitados através da administração subcutânea de ivermectina (200 µg/ por kg de peso vivo). Os quatro vitelos tratados recuperaram dos quadros agudos de theileriose tropical. Uma semana após o tratamento, os vitelos apresentavam as mucosas menos anémicas

Theileriose tropical em bovinos de carne na região do Alentejo

Universidade de Évora, 2011

(mais rosadas) e sem petéquias, diminuição da hipertrofia dos linfonodos superficiais e ausência de exoftalmia. Em alguns casos, o simples facto de apanhar os vitelos a campo para reavaliação foi muito complicado ou mesmo impossível, o que indicava que os animais apresentavam melhorias significativas. Relativamente aos nódulos cutâneos e subcutâneos, mantiveram-se durante algum tempo após o tratamento com buparvaquona, mas passado três semanas eram quase imperceptíveis.

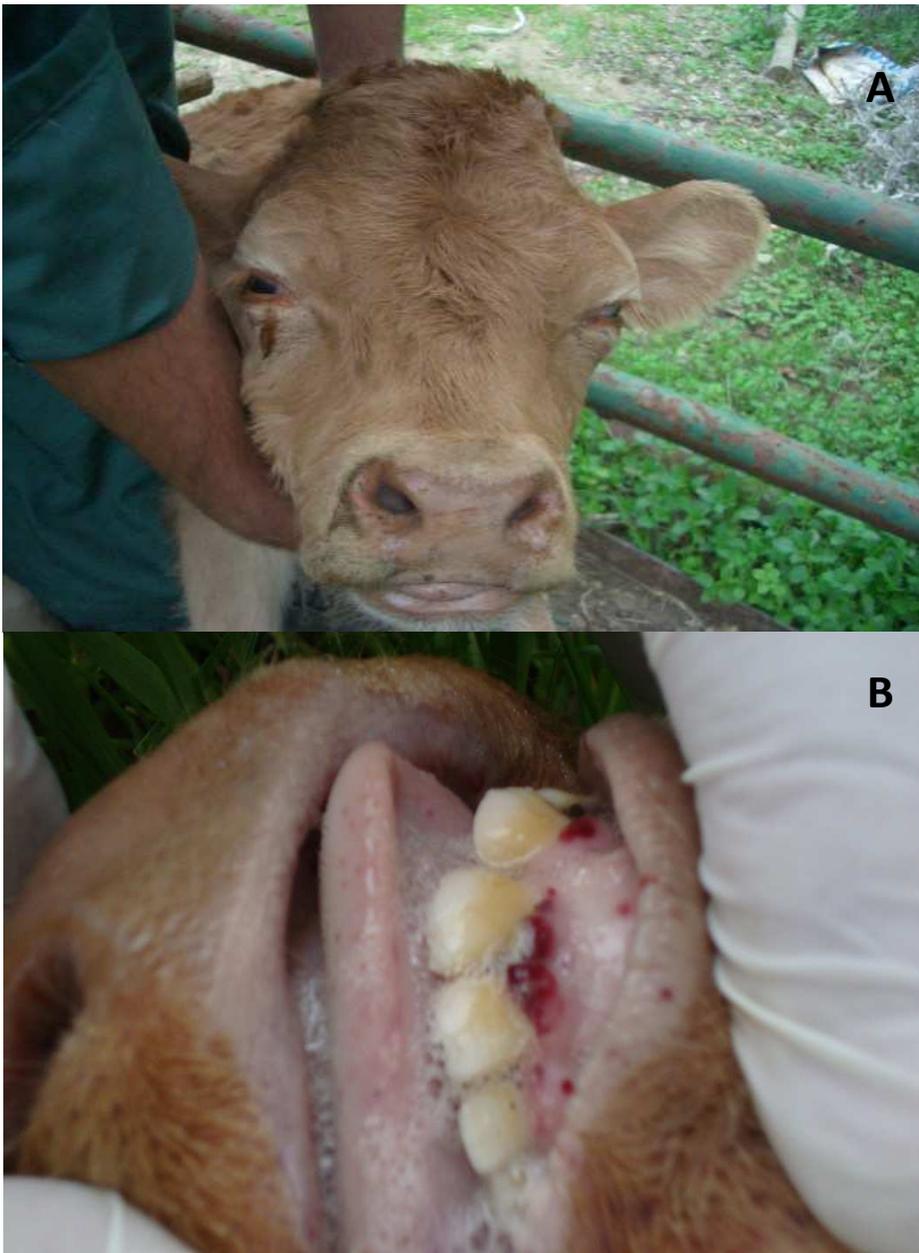


Figura 8 – Sinais clínicos observados nos vitelos com theileriose tropical: A) exoftalmia bilateral; B) petéquias na mucosa oral.

Branco *et al.* (2010) investigaram quinze casos de infecção aguda letal em vitelos no sul do país, e concluíram que se tratava de infecções pelo protozoário *Theileria annulata* (Branco *et al.*, 2010). Todos os vitelos afectados apresentavam sinais clínicos e lesões semelhantes aos casos descritos anteriormente (observados durante o estágio na Vet+). Os quinze casos de theileriose tropical conduziram à morte ou eutanásia dos animais, pouco tempo após o aparecimento dos sinais clínicos (Branco *et al.*, 2010).

Em Portugal, a theileriose tropical origina bastantes perdas económicas, essencialmente nas regiões do Alentejo e Ribatejo. Os principais prejuízos económicos advêm da morte de vitelos afectados, visto que, os bovinos adultos apesar de estarem frequentemente infectados são regra geral portadores assintomáticos. A inexistência de um fármaco eficaz comercializado em Portugal contribui para o aumento dos prejuízos, uma vez que a maioria dos casos termina com a morte do animal.

Deste modo, a realização de estudos epidemiológicos sobre a theileriose tropical é de relevante importância, na medida que permite detectar os locais/zonas onde a doença está presente e, contribuem para o estabelecimento de medidas de controlo eficazes, de modo a evitar perdas económicas.

2. Objectivo

Com base na exposição feita anteriormente na introdução ao estudo, os objectivos deste trabalho foram:

- A) Identificar e localizar geograficamente explorações infectadas com theileriose tropical;
- B) Estimar a prevalência de explorações infectadas, na amostragem em estudo;
- C) Avaliar a seroprevalência de bovinos infectados, na amostragem em estudo;
- D) Alertar para a importância desta doença na região do Alentejo, considerada uma região endémica.

3. Materiais e Métodos

3.1. Localização das Explorações

A região do Alentejo ocupa uma área de aproximadamente 27.323 km², cerca de 29% da área total de Portugal, sendo constituído por quatro NUTS III: Alentejo Litoral (5.303,2 km²), Alto Alentejo (6.247 km²), Alentejo Central (7.228,1 km²) e o Baixo Alentejo (8.544,6 km²), englobando no total 47 concelhos do território continental (Almeida *et al.*, 2002). As explorações em estudo localizavam-se essencialmente no Alentejo central (concelho de Évora, Montemor-o-Novo, Arraiolos, Vendas Novas e Viana do Alentejo) e algumas no Alentejo litoral, no concelho de Alcácer do Sal (figura 9).

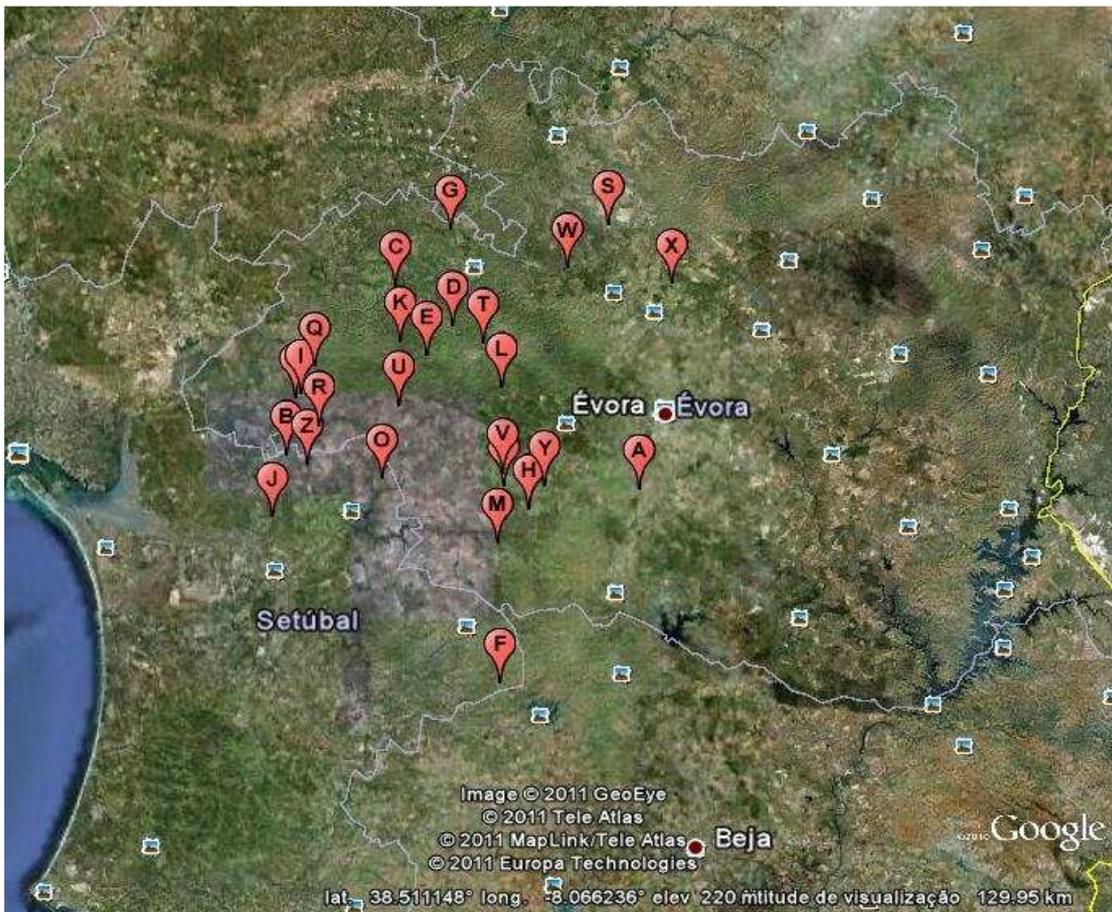


Figura 9 - Mapa da localização geográfica das explorações.

3.2. Caracterização das Explorações em Estudo

A grande maioria das explorações em estudo possui efectivos compostos por fêmeas resultantes de cruzamentos indiscriminados (“cruzada de carne”) e, frequentemente, touros de raças exóticas. A utilização de raças exóticas como o Charolês, Limousine e Blonde d’Aquitaine, permite a obtenção de vitelos com pesos superiores ao desmame, ganhos médios diários mais elevados e melhor percentagem de carcaça. No entanto, as raças exóticas são mais susceptíveis a manifestar a doença do que as raças autóctones. Em algumas explorações, é comum o cruzamento de touros de raças exóticas com vacas de raças autóctones (Mertolenga ou Alentejana), o que permite maior encabeçamento e confere maior capacidade de adaptação da vacada às constantes alterações das condições ambientais e aos longos períodos de escassez alimentar.

A grande maioria das explorações apresenta efectivos médios, isto é, entre 101 e 150 bovinos. No entanto, algumas também apresentam efectivos compostos por um número de animais ligeiramente superior e inferior ao intervalo anterior, sendo muito raras as explorações com mais de 300 bovinos, como é possível observar no gráfico 1.

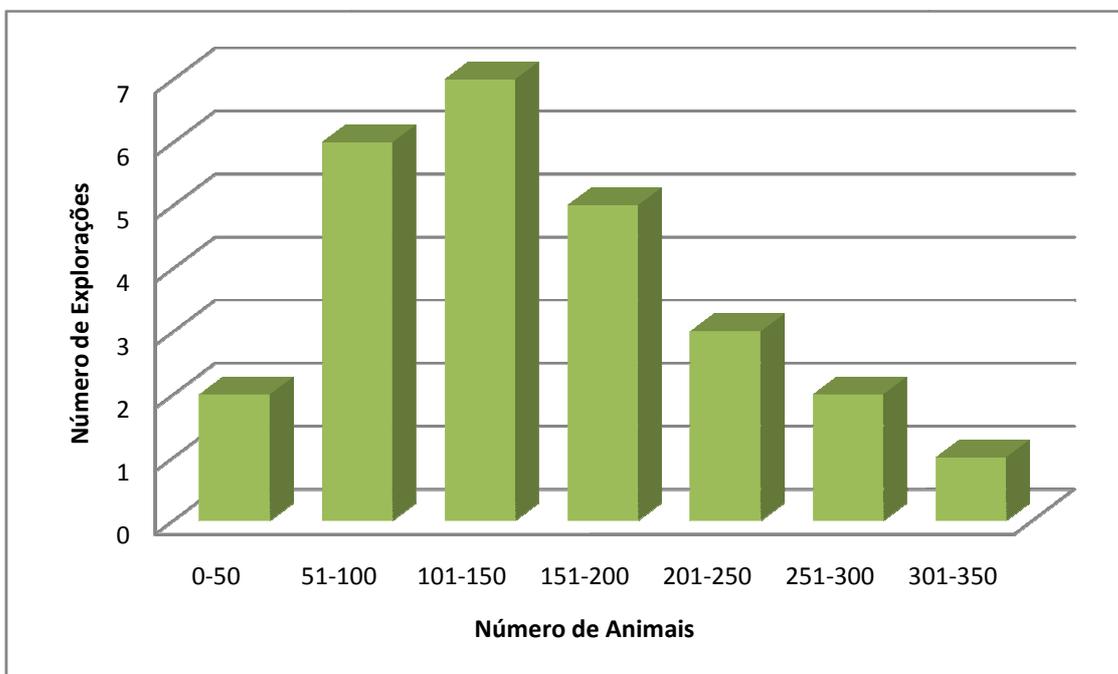


Gráfico 1 - Tamanho dos efectivos das explorações em estudo (n=26).

Theileriose tropical em bovinos de carne na região do Alentejo

Universidade de Évora, 2011

As 26 explorações em estudo praticam um regime extensivo de produção, sendo o pastoreio directo a forma mais comum de alimentação (figura 10). O manejo alimentar praticado nestes rebanhos tem como base o aproveitamento de pastagens naturais, pousios e terrenos incultos. No Outono e Inverno, os rebanhos alimentam-se do que restou da época anterior de crescimento de pastagens naturais ou melhoradas, e de bolotas e landes comuns nesta fase do ano. A Primavera é a estação em que predominam as pastagens naturais em abundância e de melhor qualidade, sendo a principal fonte de alimentação dos efectivos nesta altura. No Verão, a alimentação baseia-se essencialmente no aproveitamento de restolhos de cereais e oleaginosas. Pode haver necessidade de suplementação alimentar em parte do Outono e quase todo o Inverno, anos excepcionalmente maus e períodos em que as necessidades dos animais excedem as disponibilidades alimentares naturais (final da gestação, aleitamento, etc.) e baseiam-se em palhas de leguminosas e de trigo, mais raramente aveia ou cevada, fenos e concentrados comerciais.

Devido ao regime extensivo de produção praticado por estas explorações, os seus efectivos encontram-se mais susceptíveis de contactarem com vectores do género *Hyalomma*, do que animais que se encontrem em regimes intensivos ou semi-extensivos.

É importante referir, que na grande maioria das explorações os bovinos são desparasitados uma vez por ano, na altura das acções de colheita de sangue e rastreio da tuberculose. Em algumas explorações, os produtores em aliança com o médico veterinário, optam por desparasitar com maior regularidade. Normalmente, a desparasitação é realizada com recurso a ivermectina 1% peso/volume (p/v) associada ao clorsulon 10% p/v e a doramectina 1% p/v. Alguns produtores recorrem aos banhos com amitraz, cipermetrina e diazinão durante o verão, como meio de minimizar acções parasitárias de ectoparasitas.



Figura 10 - Regime extensivo de produção praticado nas explorações em estudo.

3.3. Amostragem

Para este estudo, foram utilizadas amostras de soro de 260 animais de 26 explorações diferentes, obtidas por punção da veia coccígea média. A colheita de amostras realizou-se entre de Dezembro de 2010 e Março de 2011. De modo a garantir que a técnica de IFA estava a ser bem executada, utilizou-se um controlo positivo e um negativo. O soro de uma vaca Holstein friesian, proveniente de uma exploração leiteira da região norte de Portugal, foi utilizado como controlo negativo. Como controlo positivo, utilizou-se soro de uma vaca proveniente de uma exploração do concelho de Montemor-o-Novo comprovadamente infectada.

Por exploração, foram colhidas amostras de sangue a 10 animais diferentes, escolhidos aleatoriamente durante as acções de sanidade realizadas pelas brigadas compostas pelos Veterinários da Vet+. As 260 amostras foram colhidas de animais

adultos, com idades compreendidas entre os 2 e os 18 anos de idade. A maioria das explorações onde foram colhidas amostras possuía animais resultantes de cruzamentos de raças, designados por “cruzado de carne” (10 explorações). Das restantes explorações, oito delas possuíam animais de raça mertolenga, uma de raça Brava, duas de raça Limousine, quatro de raça Charolês e uma de raça Blonde d’Aquitaine (gráfico 2).

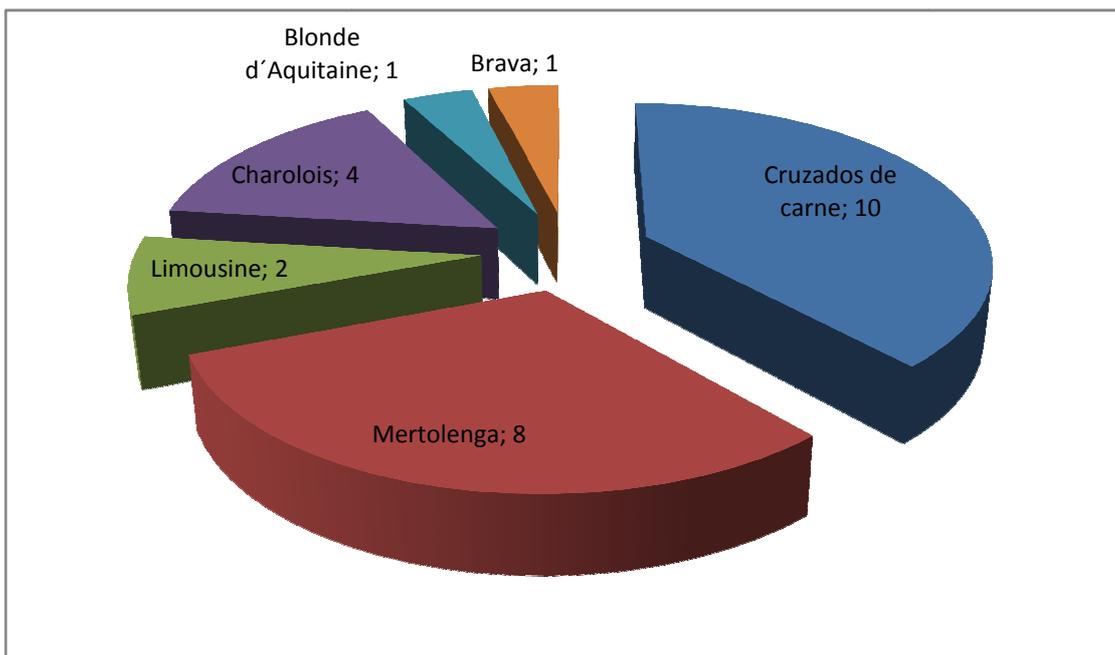


Gráfico 2 - Raças de bovinos presentes nas explorações em estudo (n=26). Os números presentes no gráfico representam a quantidade de explorações em estudo, que possuem bovinos de uma determinada raça.

3.4. Colheita, processamento e Conservação de Amostras

As amostras de sangue eram obtidas por punção da veia coccígea média (tubos sem anticoagulante) durante as acções de saneamento realizadas pelos veterinários da Vet+, e eram acondicionadas em geleiras térmicas. A cada amostra foi atribuído o número correspondente ao animal, sendo que os animais eram escolhidos aleatoriamente durante o saneamento do rebanho (10 amostras por rebanho). Uma vez na Clínica, as amostras de sangue eram conservadas a temperatura de refrigeração

(cerca de 4 °C) no frigorífico e, ao fim do dia eram centrifugadas. O soro de cada amostra era colhido para tubos de 1,5 ml com o número correspondente. As amostras de soro foram agrupadas por exploração, através da colocação dos tubos de 1,5 ml em placas de esferovite identificadas com o nome da exploração, e de seguida foram congeladas a -20 °C até processamento serológico.

3.5. Execução da Técnica de IFA

No presente estudo, recorreu-se à técnica de imunofluorescência indirecta de modo a detectar anticorpos anti-*theileria annulata*, no soro de bovinos provenientes de 26 explorações no Alentejo. As lâminas utilizadas continham esquizontes como antigénio, obtidas por esfregaços de baço de um caso fatal de theileriose tropical num vitelo. Estas lâminas encontravam-se acondicionadas em papel alumínio e congeladas no Laboratório de Parasitologia Victor Caeiro, da Universidade de Évora. A técnica de IFA foi executada de acordo com os seguintes passos:

1. As lâminas eram retiradas do congelador do laboratório e colocadas numa tina de vidro com acetona, que posteriormente foi colocada no congelador, durante 20 minutos. O objectivo da emersão das lâminas em acetona é permeabilizar a amostra;
2. Enquanto as lâminas estavam em acetona, procedeu-se a descongelação dos soros dos animais. Foram realizadas séries de 6 lâminas de cada vez, o que representa 34 soros, o controlo positivo e negativo, uma vez que em cada lâmina foram desenhados 12 “poços” e procedeu-se ao teste de duas diluições de cada soro;
3. De seguida, as lâminas foram retiradas da acetona e colocadas a secar sobre papel. Após estarem secas, eram traçados 12 círculos (“poços”) em cada lâmina, com recurso a uma caneta de tinta hidrofóbica;
4. As amostras de soro foram diluídas em PBS, numa proporção de 1/40 e de 1/160. O controlo positivo e negativo foram testados em cada conjunto de 6 lâminas, nas mesmas diluições;

5. Após a diluição dos soros em PBS, foi pipetado 20 µl de cada uma das duas diluições correspondentes a um determinado animal, para dois “poços” da lâmina consecutivos. Foram efectuadas seis lâminas de cada vez, sendo que estas foram sendo colocadas em câmara húmida à medida que eram completas;
6. Posteriormente, a câmara húmida contendo as 6 lâminas era incubada em estufa a 37 °C, durante 45 minutos. Passado 45 minutos, as lâminas eram sujeitas a 3 lavagens em água destilada;
7. De seguida, era adicionado 20 µl do anticorpo anti-bovino (AB Serotec – AAI23F) a cada um dos poços, na diluição de 1/300. As lâminas foram colocadas novamente na câmara húmida e incubadas na estufa a 37 °C, durante 45 minutos;
8. Após o tempo de incubação, as lâminas foram sujeitas a novas lavagens em água destilada, nesta fase 4 lavagens;
9. Por fim, eram colocadas as lamelas sobre as lâminas com recurso ao fluido de montagem. As lâminas eram observadas em microscópio de fluorescência, utilizando a objectiva de emersão.

A leitura dos resultados era efectuada ao final do dia, no máximo 10 lâminas, e os resultados registados.

3.6. Validação da Técnica de IFA

O teste de IFA foi considerado positivo sempre que se observou pelo menos 5 esquizontes com fluorescência, por poço (cada poço foi utilizado para testar o soro de um bovino, com uma determinada diluição). De modo a garantir que a técnica estava a ser bem executada, em todas as lâminas eram testados um controlo positivo e um negativo, com o objectivo de facilitar a leitura dos resultados e garantir que não ocorreram erros durante a execução da técnica.

4. Resultados

Os resultados obtidos através da técnica de IFA apresentaram algumas diferenças consoante a diluição do soro utilizada, tanto em relação ao número de animais diagnosticados como positivos, como à identificação das explorações em que circula a doença. Relativamente aos animais positivos, verificou-se que 143 soros continham anticorpos anti-*Theileria annulata* através da diluição de 1/40, enquanto com a diluição de 1/160, isto apenas se verificou em 111 soros (tabela 2). No caso das explorações, foram identificados animais positivos com as diluições de 1/40 e de 1/160, em 25 e 24 explorações, respectivamente (tabela 2). As explorações identificadas como positivas foram as mesmas para ambas as diluições, a excepção de uma, em que foi diagnosticado um animal positivo através da diluição de 1/40. A única exploração considerada negativa através da diluição 1/40, também foi considerada negativa pela diluição de 1/160.

Tabela 2 - Comparação dos resultados obtidos através da técnica de IFA, com as diluições de 1/40 e 1/160.

		Amostras/Soros/Bovinos			Explorações		
		Positivas	Negativas	Total	Positivas	Negativas	Total
IFAT (Diluições)	1/40	143	117	260	25	1	26
	1/160	111	149	260	24	2	26

As explorações foram consideradas positivas à theileriose tropical, sempre que, pelo menos um animal fosse considerado positivo, tendo em conta que foram colhidos 10 soros por exploração (n=10). Na sua grande maioria, foram identificados mais que dois bovinos infectados nas explorações infectadas. Com a diluição de 1/40, o número de bovinos infectados por exploração que mais se verificou foram 7 (em 7

explorações), sendo que apenas duas explorações foram identificadas como positivas com um número inferior ou igual a dois animais infectados (gráfico 3).

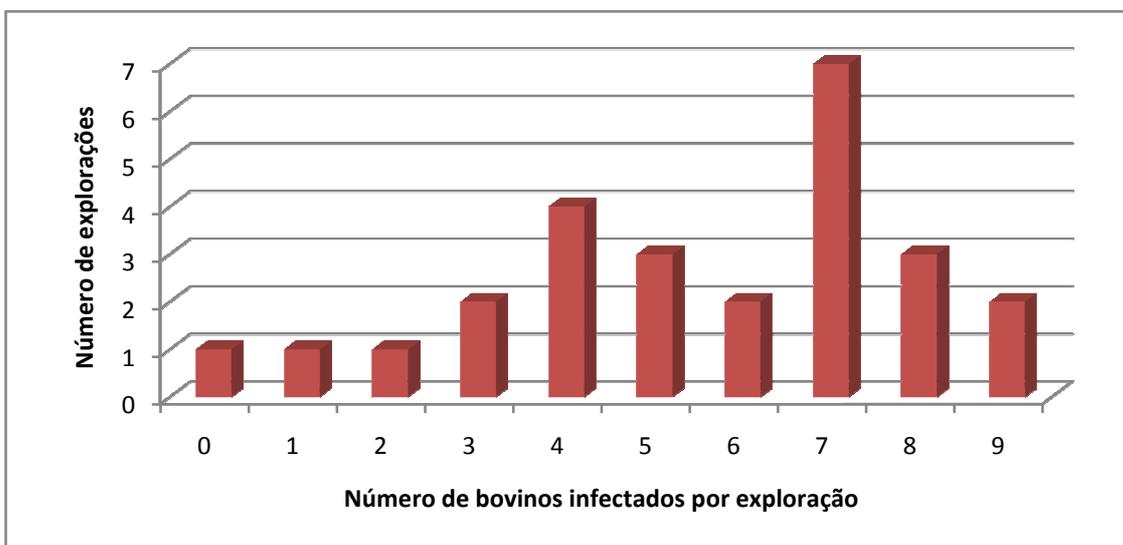


Gráfico 3 - Número de bovinos diagnosticados como infectados por exploração em estudo, resultados obtidos com a diluição 1/40 (n=26).

De acordo com a diluição de 1/160, a existência de seis animais infectados por exploração foi o que mais se observou (em 8 explorações). Neste caso, o número de explorações com um número igual ou inferior a dois animais infectados foi superior, no entanto, verificou-se que a maioria das explorações continha mais de dois animais portadores assintomáticos (gráfico 4).



Gráfico 4 - Número de bovinos diagnosticados como infectados por exploração em estudo, resultados obtidos com a diluição de 1/160 (n=26).

Os cálculos da sensibilidade de rebanho, estimativa da prevalência de explorações infectadas e estimativa da prevalência de bovinos infectados, foram realizados através de um site próprio para cálculos epidemiológicos, especialmente de saúde animal, desenvolvido pelo AusVet Animal Health Services (Sergeant, 2009).

4.1. Estimativa da Sensibilidade do Teste em Detectar uma Exploração Positiva

A probabilidade de detectar um rebanho que se encontra infectado (sensibilidade de rebanho) através da colheita de 10 amostras, utilizando o IFAT com antígeno esquizonte e os soros testados na diluição de 1/160, é de 100% (tabela 3).

Tabela 3 - Sensibilidade de rebanho com 10 amostras, utilizando a diluição de 1/160 (pelo método de MacDiarmid, 1988).

Sensibilidade de rebanho com 10 amostras	Tamanho da amostra	10
	Tamanho da população (média)	146
	Sensibilidade do teste	88,9%
	Prevalência intra-rebanho	88%
	Sensibilidade de rebanho	100%

O gráfico 5 mostra o nível de sensibilidade de rebanho para o tamanho de população específica, para vários níveis de prevalência, tamanho da amostra colhida e de acordo com a sensibilidade do teste (MacDiarmid, 1988). É possível observar através do gráfico 5, que a sensibilidade de rebanho para a dimensão da população em estudo (n=146) é sempre próximo de 100%, a medida que a prevalência intra-rebanho vai aumentando.

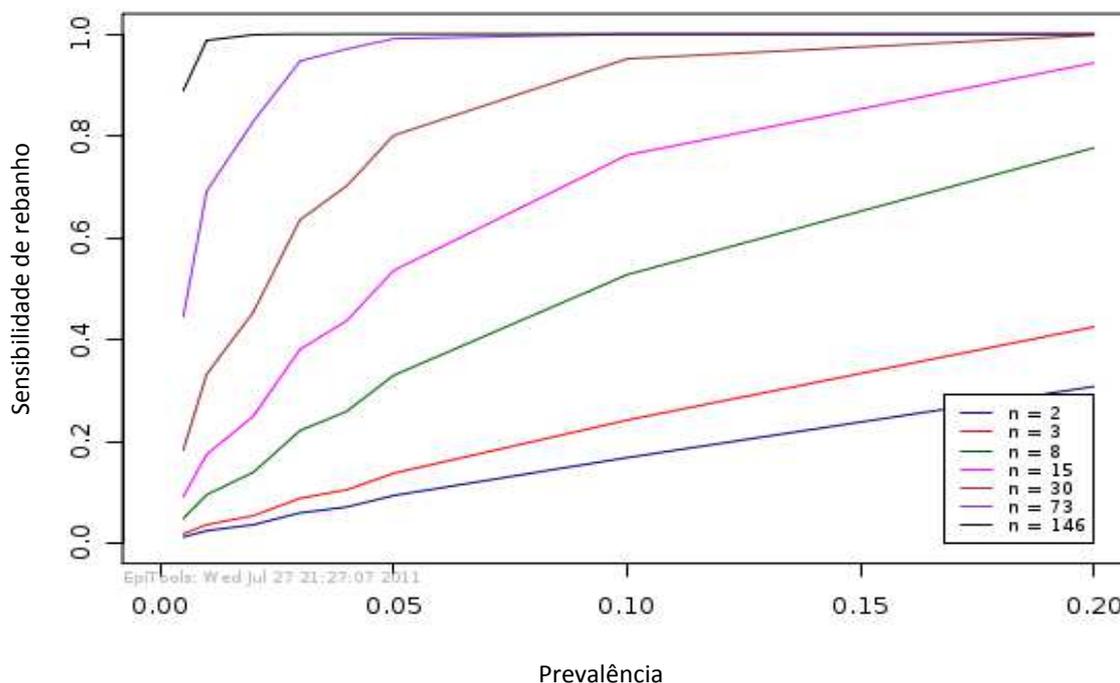


Gráfico 5 – Sensibilidade de rebanho para o tamanho da população em estudo (n = 146) (adaptado de MacDiarmid, 1988).

4.2. Estimativa da Prevalência Real de Explorações Infectadas

A prevalência real estimada para as explorações infectadas foi de 92,3%, com um intervalo de confiança entre 75,9 e 97,9%, assumindo um nível de confiança de 95%. No cálculo desta prevalência, foi considerada a sensibilidade de rebanho calculada anteriormente e assumida uma especificidade de 100% (tabela 4) (Brown *et al.*, 2001).

Tabela 4 - Estimativa da prevalência real de explorações infectadas e respectivo intervalo de confiança, através dos resultados obtidos com a diluição de 1/160 (pelo método de Brown *et al.*, 2001).

Estimativa da prevalência real de explorações infectadas	Tamanho da amostra (nº de explorações)	26
	Número de amostras positivas	24
	Sensibilidade do teste	100%
	Especificidade do teste	100%
	Nível de confiança	95%
	Prevalência aparente	92,3%
	Prevalência real	92,3%
	Limite de confiança inferior	75,9%
	Limite de confiança superior	97,9%

4.3. Identificação e Localização Geográfica das Explorações Infectadas

O estudo realizado revelou que quase todas as explorações em que foram colhidas amostras, possuíam bovinos portadores assintomáticos de *Theileria annulata* (figura 11), o que significa, que a theileriose tropical circula nestas explorações. A concordância entre as duas diluições utilizadas foi muito semelhante. Com a diluição de 1/40 foram identificadas 25 explorações como positivas e apenas uma como negativa (pequeno gráfico circular totalmente verde), enquanto com a de 1/160, identificou-se 24 explorações como positivas e duas como negativas. As duas diluições apenas manifestaram resultados diferentes em relação a uma exploração, assinalada com um triângulo amarelo.

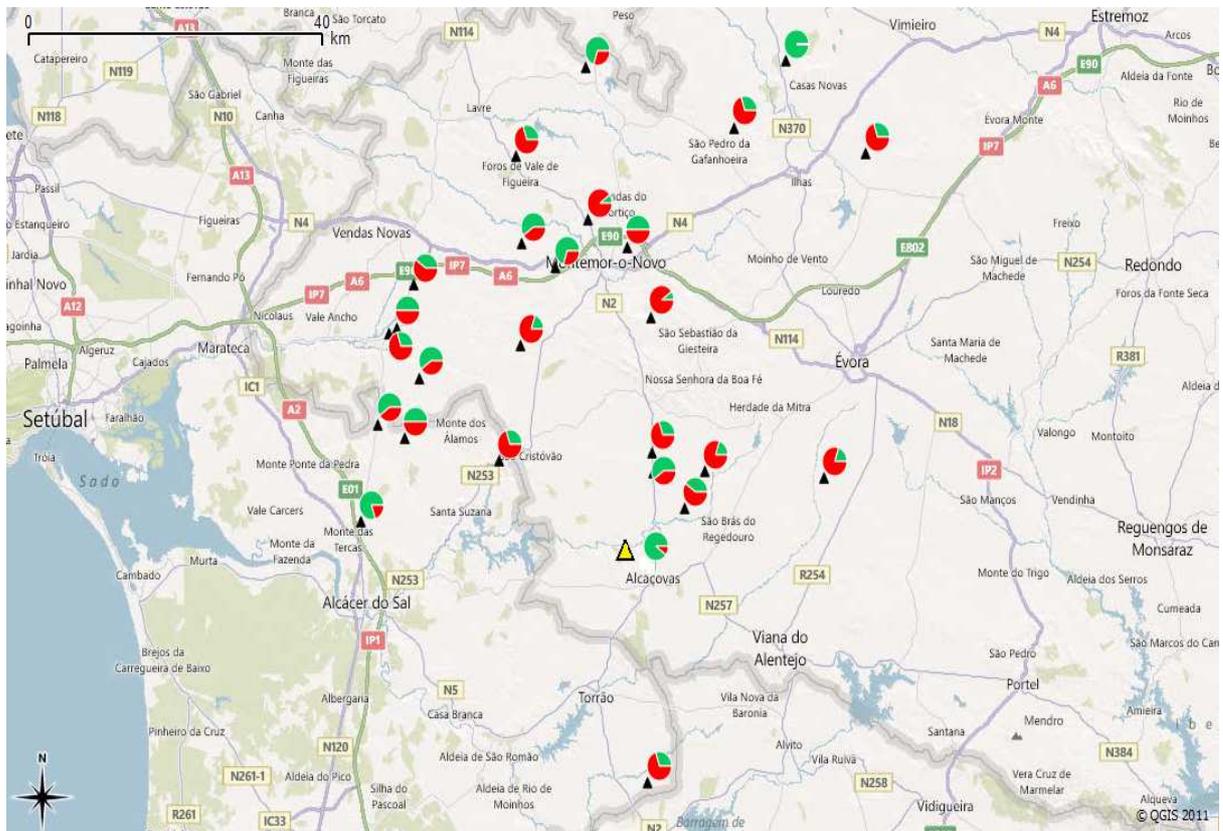


Figura 11 – Mapa com a localização geográfica e identificação das explorações positivas e negativas, realizado em função dos resultados obtidos com a diluição de 1/40. As explorações estão localizadas por meio de triângulos. Junto a cada exploração encontra-se um pequeno gráfico circular com as cores vermelha (animais seropositivos/infectados) e verde (animais seronegativos), sendo que foram colhidas 10 amostras por exploração. O triângulo amarelo representa a única exploração identificada como positiva com a diluição de 1/40, mas negativa com a diluição de 1/160.

4.4. Estimativa da Prevalência Real de Animais Infectados

A prevalência real estimada de bovinos infectados foi de 46,2%, com um intervalo de confiança entre 39,4 e 53,3%, assumindo um nível de confiança de 95% (tabela 5) (Brown *et al.*, 2001). Para a estimativa da prevalência real de animais infectados, foram considerados os valores da sensibilidade e especificidade da técnica de IFA com a diluição de 1/160, de 88,9% (64/72) e 97% (98/101), respectivamente (Darghouth *et al.*, 2004).

Tabela 5 - Estimativa da prevalência (seroprevalência) real de animais infectados e respectivo intervalo de confiança, através dos resultados obtidos com a diluição de 1/160 (pelo método de Brown *et al.*, 2001).

Estimativa da prevalência real de bovinos infectados	Tamanho da amostra (nº de animais)	260
	Número de amostras positivas	111
	Sensibilidade do teste	88,9%
	Especificidade do teste	97%
	Nível de confiança	95%
	Prevalência aparente	42,7%
	Prevalência estimada	46,2%
	Limite de confiança inferior	39,4%
	Limite de confiança superior	53,3%

5. Discussão

O presente estudo pretendeu avaliar a presença de theileriose tropical em explorações localizadas no Alentejo Central e Litoral. Tendo em conta a importância que a doença apresenta na região do Alentejo (região considerada endémica), é essencial localizar explorações em que a doença circule, bem como, estimar a prevalência real de explorações e animais infectados. Para isso, aplicou-se a técnica de IFA a amostras de soro de bovinos, para detecção de anticorpos ant-*theileria annulata*.

Os resultados obtidos demonstraram algumas diferenças consoante a diluição de soro utilizada. Estas diferenças revelaram-se mais significativas em relação ao número de amostras positivas (bovinos seropositivos), tendo sido diagnosticado 143 seropositivos em 260 testados, com a diluição de 1/40, e 111 seropositivos com a

Theileriose tropical em bovinos de carne na região do Alentejo

Universidade de Évora, 2011

diluição de 1/160 (tabela 2). Em relação à identificação de explorações infectadas, as diferenças não foram tão acentuadas, visto que, 25 e 24 explorações foram identificadas como positivas, com as diluições de 1/40 e 1/160, respectivamente (tabela 2). Na grande maioria das explorações consideradas infectadas, foram diagnosticadas como seropositivos mais de dois animais (10 bovinos testados por exploração), como é possível observar na figura 11 e gráfico 3 e 4. Estas explorações foram localizadas geograficamente com recurso a coordenadas colhidas por telemóvel, no momento da colheita das amostras (Figura 11).

A estimativa da prevalência real de explorações infectadas e animais infectados, assim como, a sensibilidade de rebanho, foram calculadas com base nos resultados obtidos através da diluição de 1/160. Esta opção assentou no facto de existirem alguns trabalhos realizados com esta diluição na bibliografia encontrada (Darghouth *et al.*, 2004, Darghouth *et al.*, 1996), nos quais é referido óptimos valores de sensibilidade e especificidade. Para além disso, o facto de não existirem estudos em theileriose tropical na bibliografia encontrada, da técnica de IFA (antigénio esquizonte) em que se aplicasse a diluição de 1/40, também contribui para esta decisão. De acordo com bibliografia utilizada, a sensibilidade e especificidade da técnica de IFA com antigénio esquizonte, com diluição de 1/160, é de 88,9% e 97%, respectivamente (Darghouth *et al.*, 2004).

Uma vez que os resultados foram obtidos através de um teste de diagnóstico, com uma sensibilidade e especificidade conhecidas, tiveram de ser estimadas as prevalências reais. As prevalências aparentes calculadas através dos resultados obtidos, não expressam a realidade (podem englobar os falsos positivos e falsos negativos), visto que, o teste de diagnóstico possui uma determinada sensibilidade e especificidade, que têm de ser consideradas. Com uma sensibilidade reduzida, obter-se-á uma prevalência real superior à aparente, devido à ocorrência de falsos negativos. Ao invés, com uma especificidade baixa, vamos obter muitos falsos positivos, verificando-se uma prevalência aparente superior à real.

A sensibilidade de rebanho do IFAT, calculada para uma população em média de 146 bovinos, na qual foram colhidas 10 amostras, foi de 100%, utilizando a diluição

Theileriose tropical em bovinos de carne na região do Alentejo

Universidade de Évora, 2011

de 1/160. Para o cálculo da sensibilidade de rebanho foram necessários dois valores essenciais, a sensibilidade do teste (probabilidade de um animal infectado ser identificado pelo teste como positivo) e o conhecimento da prevalência de theileriose tropical intra-rebanho, no Alentejo. Além disso, o conhecimento do tamanho dos efectivos das explorações em estudo também foi indispensável para este cálculo, de modo a conhecer a probabilidade de detectar um rebanho infectado através da colheita de 10 amostras por rebanho e, sabendo a sensibilidade do teste e a prevalência intra-rebanho. O valor da prevalência intra-rebanho utilizado foi de 88%, de acordo com um estudo realizado por Centeno-Lima *et al.*, numa exploração no Alentejo (Brigido *et al.*, 2004). Relativamente à sensibilidade do teste, a técnica de IFA (antigénio esquizonte) com a diluição de 1/160, apresenta uma sensibilidade de 88,9% (Darghouth *et al.*, 2004). Nesta análise, de acordo com o método estatístico de MacDiarmid (1988), foi assumido que o teste possui uma especificidade de 100% (MacDiarmid, 1988).

Em relação à prevalência de explorações infectadas, estimou-se uma prevalência real de 92,3%, com um intervalo de confiança entre 75,9 e 97,9%, e assumindo um nível de confiança de 95%. Para a estimativa desta prevalência de explorações infectadas, considerou-se a sensibilidade de rebanho calculada anteriormente (100%), visto que, representa a probabilidade de um rebanho infectado ser identificado como positivo pelo teste de diagnóstico, e assumiu-se uma especificidade de 100%. Apesar da estimativa desta prevalência ter sido calculada assumindo o teste como imperfeito, obteve-se uma prevalência real igual à prevalência aparente (92,3%). Este facto deve-se aos valores da sensibilidade (100%) e especificidade (100%) utilizados, ou seja, com estes valores o teste de diagnóstico utilizado pode considerar-se um teste perfeito.

Perante a elevada prevalência de explorações infectadas, e tendo em conta a prevalência intra-rebanho (88%) na região do Alentejo (região endémica), poder-se-á considerar a hipótese de 92,3% das explorações de bovinos existentes no Alentejo possuírem a doença. No entanto, devido à amostragem ser constituída apenas por 26 explorações, e ao facto de em cada exploração só ter sido colhido 10 amostras, não

Theileriose tropical em bovinos de carne na região do Alentejo

Universidade de Évora, 2011

permite afirmar que a prevalência de explorações infectadas em todo o Alentejo seja igual à obtida no estudo. Para isso, a amostragem teria de ser constituída por um número mais significativo de explorações, com uma distribuição geográfica alargada a toda a região do Alentejo.

Por último, a prevalência real de animais infectados com o protozoário *Theileria annulata*, utilizando a diluição de 1/160, foi de 46,2%, com um intervalo de confiança entre 39,4 e 53,3%, e assumindo um nível de confiança de 95%. Para este cálculo, foram considerados os valores de sensibilidade (88,9%) e especificidade (97%) da técnica de IFA com a diluição de 1/160, obtidos por Darghouth *et al.* (2004), a quando da avaliação desta técnica (Darghouth *et al.*, 2004).

A prevalência real estimada de 46,2% é superior ao valor da prevalência aparente de 42,7% (111/260), o que se deve ao facto do IFAT ter sido considerado um teste imperfeito, com uma sensibilidade de 88,9% e uma especificidade de 97%. Este resultado deve-se essencialmente a sensibilidade do teste, que sendo 88,9%, permite a ocorrência de alguns falsos negativos, ou seja, alguns animais diagnosticados como negativos, na realidade são seropositivos. Por outro lado, com uma especificidade de 97%, a ocorrência de falsos positivos é pouco significativa.

Como todas as técnicas de diagnóstico, o IFAT apresenta vantagens e desvantagens, sendo a sua principal desvantagem, a possibilidade de ocorrência de reacções cruzadas em locais onde coexistem outras espécies. O facto de a *T. annulata* apresentar reactividade cruzada com a *T. parva*, é pouco significativo, visto que, a distribuição geográfica das duas espécies é diferente (Office International des Epizooties, 2008), não se observando infecções por *Theileria parva* em Portugal.

O principal objectivo deste trabalho assentou na identificação e localização geográfica de explorações infectadas com theileriose tropical. Através dos resultados obtidos, observou-se que quase a totalidade das explorações em estudo se encontravam infectadas, tendo-se obtido uma prevalência de 92,3%.

6. Conclusão

Este estudo representa um importante contributo para o conhecimento da ocorrência de theileriose tropical na região do Alentejo, considerada endémica, juntamente com a região do Ribatejo.

Das 26 explorações em estudo, verificou-se que 92,3% continham bovinos infectados pelo protozoário *Theileria annulata*, sendo que na sua grande maioria foram diagnosticados mais de dois animais positivos (em 10 testados). Relativamente à prevalência de animais infectados, obteve-se uma prevalência real de 46,2%, o que significa que aproximadamente metade dos bovinos testados eram portadores assintomáticos do parasita.

A identificação e localização geográfica das explorações infectadas com a doença são de extrema importância, não só, para alertar a classe veterinária, mas também os próprios proprietários, de modo a poderem aplicar medidas de controlo de vectores eficazes, que muitas vezes são negligenciadas.

O facto de não se comercializar em Portugal o fármaco de eleição para o tratamento da theileriose tropical (buparvaquona), representa uma importante limitação nas possibilidades terapêuticas à disposição dos médicos veterinários para o tratamento da doença, que na maioria dos casos resulta na morte do animal. Com base nos resultados obtidos neste estudo, e analisando outros estudos sobre a doença realizados em Portugal, torna-se controverso a não comercialização de uma fármaco eficaz, visto estarmos num país onde muitos efectivos se encontram infectados.

Em conclusão, os dados obtidos realçam a importância que a infecção por *Theileria annulata* representa no Alentejo. Para melhor compressão do panorama da doença em Portugal, seria necessário a realização de mais estudos, visando o conhecimento da epidemiologia da doença em todo o território nacional.

III- Bibliografia

- Ahmed, J. S., Glass, E. J., Salih, D. A., & Seitzer, U. (2008). Innate immunity to tropical theileriosis. *Innate. Immun.* 14, 5-12, doi:14/1/5 [pii];10.1177/1753425907087258 [doi].
- Ahmed, J. S. & Mehlhorn, H. (1999). Review: the cellular basis of the immunity to and immunopathogenesis of tropical theileriosis. *Parasitol. Res.* 85, 539-549.
- Aktas, M., Dumanli, N., & Angin, M. (2004). Cattle infestation by Hyalomma ticks and prevalence of Theileria in Hyalomma species in the east of Turkey. *Vet. Parasitol.* 119, 1-8, doi:10.1016/j.vetpar.2003.10.013 [doi];S0304401703004552 [pii].
- Almeida, L. T., Alves, A., Carmo, M. J., Silva, M. S., & Almeida, T. (2002). Caracterização da Região de Lisboa e Vale do Tejo e da Região do Alentejo. 1º relatório, Universidade Técnica de Lisboa: Instituto Superior Técnico.
- Almeria, S., Castella, J., Ferrer, D., Ortuno, A., Estrada-Pena, A., & Gutierrez, J. F. (2001). Bovine piroplasms in Minorca (Balearic Islands, Spain): a comparison of PCR-based and light microscopy detection. *Vet. Parasitol.* 99, 249-259, doi:S0304-4017(01)00464-2 [pii].
- Almeria, S., Delgado-Neira, Y., Adelantado, C., Huguet, M., Vinent, J., & Nicolas, A. (2009). Mediterranean theileriosis and other tick transmitted piroplasmoses in cattle in Minorca (Balearic Islands, Spain): the effect of tick control on prevalence levels analyzed by reverse line blot (RLB) macroarrays. *J. Parasitol.* 95, 598-603, doi:GE-1687 [pii];10.1645/GE-1687.1 [doi].
- Altay, K., Aktas, M., & Dumanli, N. (2007). [PCR-RFLP analysis of the Tams1 gene of Theileria annulata]. *Turkiye. Parazitol. Derg.* 31, 173-175.

- Altug, N., Yuksek, N., Agaoglu, Z. T., & Keles, I. (2008). Determination of adenosine deaminase activity in cattle naturally infected with *Theileria annulata*. *Trop. Anim Health Prod.* *40*, 449-456, doi:10.1007/s11250-007-9119-9 [doi].
- Bakheit, M. A., Schnittger, L., Salih, D. A., Boguslawski, K., Beyer, D., Fadl, M., & Ahmed, J. S. (2004). Application of the recombinant *Theileria annulata* surface protein in an indirect ELISA for the diagnosis of tropical theileriosis. *Parasitol. Res.* *92*, 299-302, doi:10.1007/s00436-003-1055-7 [doi].
- Bouattour, A., Darghouth, M. A., & Ben, M. L. (1996). Cattle infestation by *Hyalomma* ticks and prevalence of *Theileria* in *H. detritum* species in Tunisia. *Vet. Parasitol.* *65*, 233-245.
- Branco, S., Orvalho, J., Leitao, A., Pereira, I., Malta, M., Mariano, I., Carvalho, T., Baptista, R., Shiels, B. R., & Peleteiro, M. C. (2010). Fatal cases of *Theileria annulata* infection in calves in Portugal associated with neoplastic-like lymphoid cell proliferation. *J. Vet. Sci.* *11*, 27-34, doi:201003027 [pii].
- Brigido, C., da Fonseca, I. P., Parreira, R., Fazendeiro, I., do Rosario, V. E., & Centeno-Lima, S. (2004). Molecular and phylogenetic characterization of *Theileria* spp. parasites in autochthonous bovines (Mirandesa breed) in Portugal. *Vet. Parasitol.* *123*, 17-23, doi:10.1016/j.vetpar.2004.05.024 [doi];S0304401704002419 [pii].
- Brown, C. G. (1990). Control of tropical theileriosis (*Theileria annulata* infection) of cattle. *Parassitologia* *32*, 23-31.
- Brown, L. D., Cat, T. T., & DasGupta, A. (2001). Interval Estimation for a proportion. *Statistical Science* *16*, 101-133.
- Caeiro, V. (1982). Theileriose. Departamento de Sanidade Animal e Vegetal da Universidade de Évora.
- Caeiro, V. (1999). General review of tick species present in Portugal. *Parassitologia* *41 Suppl 1*, 11-15.

- Campbell, J. D. & Spooner, R. L. (1999). Macrophages behaving badly: infected cells and subversion of immune responses to *Theileria annulata*. *Parasitol. Today* 15, 10-16, doi:S0169-4758(98)01359-3 [pii].
- Campbell, J. D., Brown, D. J., Nichani, A. K., Howie, S. E., Spooner, R. L., & Glass, E. J. (1997). A non-protective T helper 1 response against the intra-macrophage protozoan *Theileria annulata*. *Clin. Exp. Immunol.* 108, 463-470.
- CFSPH - Center for Food Security and Public Health, C. o. V. M. I. U. E. (2009). Theileriosis pp. 1-4.
- d'Oliveira, C., van der Weide, M., Habela, M. A., Jacquiet, P., & Jongejan, F. (1995). Detection of *Theileria annulata* in blood samples of carrier cattle by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 33, 2665-2669.
- Darghouth, M. A. (2008). Review on the experience with live attenuated vaccines against tropical theileriosis in Tunisia: considerations for the present and implications for the future. *Vaccine* 26 Suppl 6, G4-G10, doi:S0264-410X(08)01344-3 [pii];10.1016/j.vaccine.2008.09.065 [doi].
- Darghouth, M. A., Boulter, N. R., Gharbi, M., Sassi, L., Tait, A., & Hall, R. (2006). Vaccination of calves with an attenuated cell line of *Theileria annulata* and the sporozoite antigen SPAG-1 produces a synergistic effect. *Vet. Parasitol.* 142, 54-62, doi:S0304-4017(06)00357-8 [pii];10.1016/j.vetpar.2006.06.010 [doi].
- Darghouth, M. A., Sassi, L., Gharbi, M., Soudani, M. C., Karoui, M., & Krichi, A. (2004). Detection of natural infections with *Theileria annulata* on calves at first theileriosis season: comparison of the Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT) and blood smears. *Arch. Inst. Pasteur Tunis* 81, 41-45.
- Darghouth, M. E., Bouattour, A., Ben, M. L., & Sassi, L. (1996). Diagnosis of *Theileria annulata* infection of cattle in Tunisia: comparison of serology and blood smears. *Vet. Res.* 27, 613-621, doi:S0928424996898543 [pii].

- Dumanli, N., Aktas, M., Cetinkaya, B., Cakmak, A., Koroglu, E., Saki, C. E., Erdogmus, Z., Nalbantoglu, S., Ongor, H., Simsek, S., Karahan, M., & Altay, K. (2005). Prevalence and distribution of tropical theileriosis in eastern Turkey. *Vet. Parasitol.* 127, 9-15, doi:S0304-4017(04)00381-4 [pii];10.1016/j.vetpar.2004.08.006 [doi].
- Durrani, A. Z. & Kamal, N. (2008). Identification of ticks and detection of blood protozoa in friesian cattle by polmerase chain reacton test and estimation of blood parameters in district Kasur, Pakistan. *Trop. Anim Health Prod.* 40, 441-447, doi:10.1007/s11250-007-9117-y [doi].
- El-Deeb, W. M. & Younis, E. E. (2009). Clinical and biochemical studies on Theileria annulata in Egyptian buffaloes (*Bubalus bubalis*) with particular orientation to oxidative stress and ketosis relationship. *Vet. Parasitol.* 164, 301-305, doi:S0304-4017(09)00341-0 [pii];10.1016/j.vetpar.2009.06.002 [doi].
- Fandamu, P. (2005)., Transmission and infection dynamics of Theileriosis in Southern Zambia: The effect of environmental and host factors. Tese de Doutoramento em Medicina Veterinária, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Physiology and Biometrics - Ghent University.
- Forsyth, L. M., Minns, F. C., Kirvar, E., Adamson, R. E., Hall, F. R., McOrist, S., Brown, C. G., & Preston, P. M. (1999). Tissue damage in cattle infected with Theileria annulata accompanied by metastasis of cytokine-producing, schizont-infected mononuclear phagocytes. *J. Comp Pathol.* 120, 39-57, doi:S0021-9975(98)90256-0 [pii];10.1053/jcpa.1998.0256 [doi].
- Garcia-Sanmartin, J., Nagore, D., Garcia-Perez, A. L., Juste, R. A., & Hurtado, A. (2006). Molecular diagnosis of Theileria and Babesia species infecting cattle in Northern Spain using reverse line blot macroarrays. *BMC. Vet. Res.* 2, 16, doi:1746-6148-2-16 [pii];10.1186/1746-6148-2-16 [doi].
- Gharbi, M., Sassi, L., Dorchies, P., & Darghouth, M. A. (2006). Infection of calves with Theileria annulata in Tunisia: Economic analysis and evaluation of the potential

benefit of vaccination. *Vet. Parasitol.* 137, 231-241, doi:S0304-4017(06)00032-X [pii];10.1016/j.vetpar.2006.01.015 [doi].

Glass, E. J., Craigmile, S. C., Springbett, A., Preston, P. M., Kirvar, E., Wilkie, G. M., Eckersall, P. D., Hall, F. R., & Brown, C. G. (2003). The protozoan parasite, *Theileria annulata*, induces a distinct acute phase protein response in cattle that is associated with pathology. *Int. J. Parasitol.* 33, 1409-1418, doi:S0020751903001668 [pii].

Godara, R., Sharma, R. L., & Sharma, C. S. (2010). Bovine tropical theileriosis in a neonate calf. *Trop. Anim Health Prod.* 42, 551-553, doi:10.1007/s11250-009-9469-6 [doi].

Gubbels, J. M., De Vos, A. P., van der Weide, M., Viseras, J., Schouls, L. M., de, V. E., & Jongejan, F. (1999). Simultaneous detection of bovine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blot hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1782-1789.

Gubbels, M. J., d'Oliveira, C., & Jongejan, F. (2000). Development of an indirect Tams1 enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Theileria annulata* infection in cattle. *Clin. Diagn. Lab Immunol.* 7, 404-411.

Habela, M., Rol, J. A., Anton, J. M., Pena, J., Corchero, E., van, H., I, & Jongejan, E. (1999). Epidemiology of Mediterranean theileriosis in Extremadura region, Spain. *Parassitologia 41 Suppl 1*, 47-51.

Haque, M., Jyoti, Singh, N. K., & Rath, S. S. (2010). Prevalence of *Theileria annulata* infection in *Hyalomma anatolicum anatolicum* in Punjab state, India. *J. Parasit. Dis.* 34, 48-51, doi:10.1007/s12639-010-0004-5 [doi].

Hasanpour, A., Moghaddam, G. A., & Nematollahi, A. (2008). Biochemical, hematological, and electrocardiographic changes in buffaloes naturally infected with *Theileria annulata*. *Korean J. Parasitol.* 46, 223-227, doi:10.3347/kjp.2008.46.4.223 [doi].

Theileriose tropical em bovinos de carne na região do Alentejo

Universidade de Évora, 2011

- Hashemi-Fesharki, R., Golchinfar, F., Madani, R., & Esmaeilnia, K. (2006). Comparative evaluation of antibody positive titer by ELISA and IFA in *Theileria annulata* vaccinated cattle in Iran. *Parasite* 13, 71-74.
- Irvin, A. D. (1987). *Advances in Parasitology* Vol. 26, edited by J. R. Baker & R. Muller, pp. 145-178. London: ACADEMIC PRESS INC. (LONDON) LTD.
- Lawrence, J. A., Perry, B. D., & Williamson, S. M. (2004). *Infectious Diseases of Livestock* 2 ed., Vol. 1, edited by J. A. W. Coetzer & R. C. Tustin, pp. 448-467. Cape Town: Oxford University Press.
- Leitão, J. L. S. (1945). *Repositório de Trabalhos do Laboratório Central de Patologia Veterinária* Vol. II pp. 1-8. Lisboa.
- MacDiarmid, S. C. (1988). *NZ Vet. J.* 36, 39-42.
- Manuja, A., Nichani, A. K., Kumar, R., Sharma, R. D., & Kumar, B. (2001). Single dilution ELISAs using soluble piroplasm, cellular schizont and soluble schizont antigens for the detection of antibodies against *Theileria annulata*. *Vet. Res.* 32, 165-173, doi:10.1051/vetres:2001101 [doi].
- McKeever, D. J. (2009). Bovine immunity - a driver for diversity in *Theileria* parasites? *Trends Parasitol.* 25, 269-276, doi:S1471-4922(09)00087-7 [pii];10.1016/j.pt.2009.03.005 [doi].
- Mehlhorn, H., Schein, E., & Warnecke, M. (1978). Electron microscopic studies on the development of kinetes of *Theileria parva* Theiler, 1904 in the gut of the vector ticks *Rhipicephalus appendiculatus* Neumann, 1901. *Acta Trop.* 35, 123-136.
- Mehlhorn, H. & Shein, E. (1984). The piroplasms: life cycle and sexual stages. *Adv. Parasitol.* 23, 37-103.
- Mhadhbi, M., Naouach, A., Boumiza, A., Chaabani, M. F., BenAbderazzak, S., & Darghouth, M. A. (2010). In vivo evidence for the resistance of *Theileria annulata*

Theileriose tropical em bovinos de carne na região do Alentejo

Universidade de Évora, 2011

- to buparvaquone. *Vet. Parasitol.* 169, 241-247, doi:S0304-4017(10)00032-4 [pii];10.1016/j.vetpar.2010.01.013 [doi].
- Mirzaei, M. (2007). Treatment of natural tropical theileriosis with the extract of the plant *Peganum harmala*. *Korean J. Parasitol.* 45, 267-271, doi:200712267 [pii].
- Mohammad Al-Saeed, A. T., Omer, L. T., Abdo, J., Habibi, G., Salih, D. A., Seitzer, U., & Ahmed, J. (2010). Epidemiological studies on tropical theileriosis (*Theileria annulata* infection of cattle) in Kurdistan Region, Iraq. *Parasitol. Res.* 106, 403-407, doi:10.1007/s00436-009-1675-7 [doi].
- Nagore, D., Garcia-Sanmartin, J., Garcia-Perez, A. L., Juste, R. A., & Hurtado, A. (2004). Detection and identification of equine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blotting: epidemiological survey and phylogenetic analysis. *Vet. Parasitol.* 123, 41-54, doi:10.1016/j.vetpar.2004.04.010 [doi];S0304401704002353 [pii].
- Navarrete, I., Serrano, F. J., & Reina, D. (2002). *Parasitología Veterinaria* 3 ed., edited by M. C. Campillo & F. A. R. Vásquez, pp. 294-302. Madrid: McGRAW-HILL-INTERAMERICANA DE ESPAÑA, S.A.U.
- Nazifi, S., Razavi, S. M., Esmailnejad, Z., & Gheisari, H. (2009). Study on acute phase proteins (haptoglobin, serum amyloid A, fibrinogen, and ceruloplasmin) changes and their diagnostic values in bovine tropical theileriosis. *Parasitol. Res.* 105, 41-46, doi:10.1007/s00436-009-1360-x [doi].
- Office International des Épizooties (2008). *OIE Terrestrial Manual Health Code. Chapter 2.4.16, Theileriosis*. Paris: OIE.
- Office International des Épizooties (2009). *OIE Technical Disease Card. Theileriosis*. Paris: OIE.
- Omer, O. H., El-Malik, K. H., Mahmoud, O. M., Haroun, E. M., Hawas, A., Sweeney, D., & Magzoub, M. (2002). Haematological profiles in pure bred cattle naturally infected with *Theileria annulata* in Saudi Arabia. *Vet. Parasitol.* 107, 161-168, doi:S0304401702000948 [pii].

- Omer, O. H., Mahmoud, O. M., & Al-Sadrani, A. A. (2011). Evaluation of the Acridine Orange Fluorescence Technique and Indirect Fluorescent Antibody as Diagnostic Tests for Tropical Theileriosis . *Veterinary World* 4, 341-344.
- Osman, S. A. & Al-Gaabary, M. H. (2007). Clinical, haematological and therapeutic studies on tropical theileriosis in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Egypt. *Vet. Parasitol.* 146, 337-340, doi:S0304-4017(07)00158-6 [pii];10.1016/j.vetpar.2007.03.012 [doi].
- Pipano, E. & Shkap, V. (2004). *Infectious Diseases of Livestock* 2 ed., Vol. 1, edited by J. A. W. Coetzer & R. C. Tustin, pp. 486-497. Cape Town: OXFORD University Press.
- Preston, P. M., Hall, F. R., Glass, E. J., Campbell, J. D., Darghouth, M. A., Ahmed, J. S., Shiels, B. R., Spooner, R. L., Jongejan, F., & Brown, C. G. (1999). Innate and adaptive immune responses co-operate to protect cattle against *Theileria annulata*. *Parasitol. Today* 15, 268-274, doi:S0169-4758(99)01466-0 [pii].
- Radostits, O. M., Gay, C. C., Blood, D. C., & Hinchcliff, K. W. (2002). *Clínica Veterinária: Um Tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos e Equinos* 9 ed., edited by O. M. Radostits, C. C. Gay, D. C. Blood, & K. W. Hinchcliff, pp. 1156-1202. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.
- Ramazan, C. & Ugur, U. (2006). Haematological and coagulation profiles during severe Tropical Theileriosis in cattle. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science* 30, 577-582.
- Razavi, S. M., Nazifi, S., Emadi, M., & Rakhshandehroo, E. (2010). The correlations among serum tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), interferon-gamma (IFN-gamma) and sialic acids with peripheral lymphocytes in bovine tropical theileriosis. *Vet. Res. Commun.* 34, 579-587, doi:10.1007/s11259-010-9429-7 [doi].

Theileriose tropical em bovinos de carne na região do Alentejo

Universidade de Évora, 2011

- Renneker, S., Abdo, J., Ahmed, J. S., & Seitzer, U. (2009). Field validation of a competitive ELISA for detection of *Theileria annulata* infection. *Parasitol. Res.* *106*, 47-53, doi:10.1007/s00436-009-1625-4 [doi].
- Salih, D. A., El Hussein, A. M., Kyule, M. N., Zessin, K. H., Ahmed, J. S., & Seitzer, U. (2007). Determination of potential risk factors associated with *Theileria annulata* and *Theileria parva* infections of cattle in the Sudan. *Parasitol. Res.* *101*, 1285-1288, doi:10.1007/s00436-007-0634-4 [doi].
- Sandhu, G. S., Grewal, A. S., Singh, A., Kondal, J. K., Singh, J., & Brar, R. S. (1998). Haematological and biochemical studies on experimental *Theileria annulata* infection in crossbred calves. *Vet. Res. Commun.* *22*, 347-354.
- Sayin, F., Dincer, S., Karaer, Z., Cakmak, A., Inci, A., Yukari, B. A., Eren, H., Vatansever, Z., & Nalbantoglu, S. (2003). Studies on the epidemiology of tropical theileriosis (*Theileria annulata* infection) in cattle in Central Anatolia, Turkey. *Trop. Anim Health Prod.* *35*, 521-539.
- Sergeant, E. S. G. (2009). Epitools epidemiological calculators AusVet Animal Health Services and Australian Biosecurity Cooperative Research Center for Emerging Infectious Disease. Disponível em: <http://epitools.ausvet.com.au>.
- Shaw, M. K. (2003). Cell invasion by *Theileria* sporozoites. *Trends Parasitol.* *19*, 2-6, doi:S1471492202000156 [pii].
- Shkap, V., Leibovitch, B., Krigel, Y., Fish, L., & Orgad, U. (2010). Evaluation of the combined formulation of Parvaquone and Frusemid (Fruvexon) in the treatment of experimental Tropical Theileriosis. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine* *8*, 73-76.
- 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. *Vet. Parasitol.* *174*, 199-205, doi:S0304-4017(10)00493-0 [pii];10.1016/j.vetpar.2010.08.038 [doi].

Theileriose tropical em bovinos de carne na região do Alentejo
Universidade de Évora, 2011

Taylor, S. M., Hunter, A. G., & Andrews, A. H. (2004). *Bovine Medicine: Diseases and Husbandry of Cattle* 2 ed., edited by A. H. Andrews, R. W. Blowey, H. Boyd, & R. G. Eddy, pp. 740-777. Oxford: Blackwell Publishing Ltd.

wellcome AHDW "An integrated approach for the development of sustainable methods to control tropical theileriosis", disponível em: <http://www.theileria.org>,
acedido a 15/05/11.

Zhang, Z. H. (1997). A general review on the prevention and treatment of *Theileria annulata* in China. *Vet. Parasitol.* 70, 77-81, doi:S0304-4017(96)01127-2 [pii].