

## Contribuição para o estudo da besnoitiose bovina em Portugal

## Contribution to the knowledge of bovine besnoitiosis in Portugal

H. Cortes<sup>1\*</sup>, M.L. Ferreira<sup>2</sup>, J.F. Silva<sup>2</sup>, R. Vidal<sup>3</sup>, P. Serra<sup>2</sup> e V. Caeiro<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Parasitologia. Polo da Mitra. Universidade de Évora.

<sup>2</sup> Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa. Universidade Técnica de Lisboa.

<sup>3</sup> Faculdade de Farmácia (Laboratório de Engenharia Genética). Universidade de Lisboa.

**Resumo:** A besnoitiose bovina é uma doença parasitária causada pelo protozoário *Besnoitia besnoiti* (Marotel, 1912) que, apresentando uma fase aguda (com febre e anasarca) e uma fase crónica (esclerodermia), se caracteriza por elevada morbilidade e baixa mortalidade (Ferreira, 1985). Num estudo efectuado em Outubro de 2001, quanto à presença desta doença numa exploração de bovinos de carne situada no distrito de Évora onde já tinham sido diagnosticados casos de besnoitiose, foram aleatoriamente separados 12 machos assintomáticos de raça Limousine, com idades compreendidas entre os 18 e os 24 meses, a partir dos quais se obtiveram biopsias de pele. Subseqüentes exames histopatológicos destas biopsias revelaram que 5 (42%) dos animais estudados continham quistos de *B. besnoiti*. Estes resultados demonstram assim a imediata necessidade de se proceder à elucidação de aspectos ainda pouco conhecidos sobre a fisiopatogenia desta doença, nomeadamente quanto às suas possíveis formas de transmissão (ou seja, determinação dos seus hospedeiros intermediários e definitivos) e quanto às suas implicações na produção animal tal como por exemplo, na fertilidade bovina e no aproveitamento de peles. Por outro lado, também sugerem que, pelo menos na região de Évora, pode ser muito elevado o número de animais assintomáticos, infectados com *B. besnoiti*, o que de igual modo se torna imperioso esclarecer.

**Palavras-chave:** protozoário; bovino; pele; *Besnoitia besnoiti*; besnoitiose bovina.

**Summary:** Bovine besnoitiosis is a parasitic disease caused by the protozoa *Besnoitia besnoiti* (Marotel, 1912) that presents an acute phase (with fever and anasarca) and a chronic phase (with sclerodermitis), and has been characterized by high morbidity and low mortality (Ferreira, 1985). A study on the presence of besnoitiosis was carried out in October 2001 on a beef cattle herd located in the Évora region. On this farm, where previous cases of besnoitiosis were diagnosed, 12 asymptomatic Limousine bulls, aged between 18 and 24 months, were randomly selected and studied. Skin biopsies were collected and prepared. Subsequent histopathologic analyses of the biopsies have shown that 5 (42%) of the animals studied harboured *B. besnoiti* cysts. Therefore, these results demonstrate the immediate need to obtain insight in to some as yet not clearly defined aspects of the physiopathogeny of this disease. Possible ways of transmission (that is, determination of intermediate as well as definite hosts) and their impact on animal production such as bovine fertility and the quality of skins for leather industry should be addressed. In addition, the cases of asymptomatic animals with *B. besnoiti* in the Évora district should be clarified.

**Keywords:** Protozoa; bovine; skin; *Besnoitia besnoiti*; bovine besnoitiosis.

### Introdução

A besnoitiose bovina é uma doença parasitária causada pelo protozoário *Besnoitia besnoiti* (Marotel, 1912) (Soulsby, 1982; Ferreira, 1985). As dimensões relatadas para os taquizoítos (formas circulantes no sangue) são por norma de 5 a 9 µm de comprimento e 1,5 a 3,8 µm de largura enquanto as dos bradizoítos são geralmente de 8,9 por 1,9 µm (Ferreira, 1985). Estas duas formas evolutivas são intracelulares, ocorrendo os taquizoítos nas células endoteliais, monócitos, histiócitos, granulócitos neutrófilos e células de Sertoli, tendo esta última localização sido referida pela primeira vez por Ferreira *et al.* (1982). Os quistos dos bradizoítos desenvolvem-se nas veias e (menos) nas artérias da derme, aponevroses, tecido conjuntivo intermuscular, mucosas nasal e laringica, globo ocular e testículo (Ferreira *et al.*, 1982; Soulsby, 1982; Ferreira e Diaz, 1984; Ferreira, 1985). As dimensões dos quistos variam entre 25 e 300 µm ou mais (sendo neste caso visíveis a olho nu) de acordo com a duração da infestação (Ferreira, 1985).

Os bovinos são os hospedeiros intermediários deste parasita na infecção natural (Ferreira, 1985) enquanto o seu hospedeiro definitivo não se encontra ainda esclarecido com precisão. Neste contexto, embora alguns autores já tenham sugerido o gato como hospedeiro definitivo, no entanto o assunto é presentemente controverso (Dubey, 1976; Levine, 1977; Soulsby, 1982; Ferreira, 1985; Rommel, 1989; Bussiéras e Chermette, 1992) até porque, de acordo com estudos anteriormente realizados na República da África do Sul, se verificou que os tabanídeos transmitem este protozoário (Bigalke, 1968) permanecendo no entanto desconhecido se outros artrópodes o podem veicular, nomeadamente alguns membros da família *Ixodidae*. Porém, sabe-se que *Glossina brevipalpis* transmite

\* Correspondência: e-mail hcec@uevora.pt

mecanicamente *B. besnoiti* a coelhos e a bovinos (Bigalke, 1960) e que agulhas hipodérmicas também podem constituir forma de transmissão deste parasita (Bigalke, 1968).

Actualmente, a besnoitiose é uma doença muito disseminada em determinadas áreas geográficas de África, atribuindo-se-lhe elevada morbilidade em efectivos bovinos. A sua patologia é predominantemente de carácter crónico, com baixa mortalidade, conduzindo ao desenvolvimento de formações nodulares ao nível da pele, tecido conjuntivo subcutâneo, membranas mucosas, aparelho digestivo, respiratório, circulatório e genito-urinário (Ferreira, 1985; Ferreira *et al.*, 1982). Em Portugal, esta parasitose foi assinalada pela primeira vez em 1915 (Franco e Borges, 1915), tendo a maioria dos casos sido detectada no Alentejo e (menos) no Ribatejo. Deste modo, tendo em vista uma primeira abordagem ao problema da besnoitiose numa exploração de bovinos de carne localizada no concelho de Évora, em Outubro de 2001 procedeu-se a um estudo nessa exploração na medida em que nela os autores já tinham anteriormente detectado bovinos adultos, da mesma raça, com sintomas clínicos de besnoitiose. Os resultados emergentes deste estudo são apresentados nesta comunicação e, brevemente, discutidos.

## Material e métodos

Numa exploração com 270 bovinos de carne localizada no concelho de Évora, onde previamente foram detectados casos clínicos de besnoitiose bovina, foram separados os 12 bovinos de raça Limousine nascidos em Portugal, do sexo masculino, com idades compreendidas entre os 18 e os 24 meses, todos eles assintomáticos.

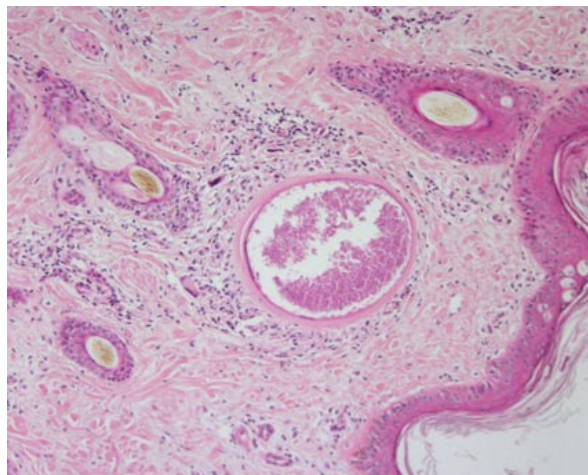
A partir de cada um destes animais foram obtidas biopsias de pele da região do pescoço, tendo em vista a detecção histopatológica de quistos de *B. besnoiti* após os tecidos terem sido fixados em formol a 10% e incluídos em parafina. Os cortes histológicos foram corados pela hematoxilina-eosina e subsequentemente examinados ao microscópio óptico.

Em 7 quistos de *B. besnoiti*, foram determinados os seus eixos maior e menor assim como a espessura das suas paredes. Para isso, utilizou-se uma ocular micrométrica (Leitz) e um micrómetro de objectiva (Leitz) de 1 mm, dividido em 100 partes (pelo que cada divisão correspondia a 10 µm), fazendo-se as medições com objectiva de x40. A ocular micrométrica foi também calibrada para a objectiva de x100, tendo em vista a determinação do comprimento e da largura dos bradizoítos.

De cada animal, foi também preparado um esfregaço de sangue que, uma vez corado pelo método de May-Grünwald-Giemsa, foi examinado ao microscópio óptico. Procedeu-se à realização de esfregaços por aposição a partir da secreção lacrimal da região periorbital de um bovino com besnoitiose.

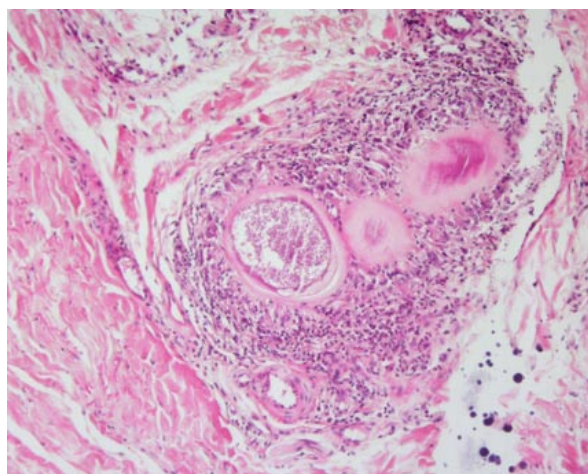
## Resultados

As biopsias continham epiderme com estruturas epiteliais anexas (folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas) e as camadas papilar e reticular da derme subjacente. Em 12 cortes histológicos, obtidos a partir de 5 animais, foram detectados 9 quistos de bradizoítos de *B. besnoiti* (Figura 1), distribuídos da seguinte forma: um quisto em cada um dos quatro cortes examinados e cinco quistos noutra corte.



**Figura 1** – Quisto de *B. besnoiti* situado na camada papilar da derme e envolvido por um infiltrado inflamatório celular ligeiro. Coloração da hematoxilina-eosina. Objectiva x10.

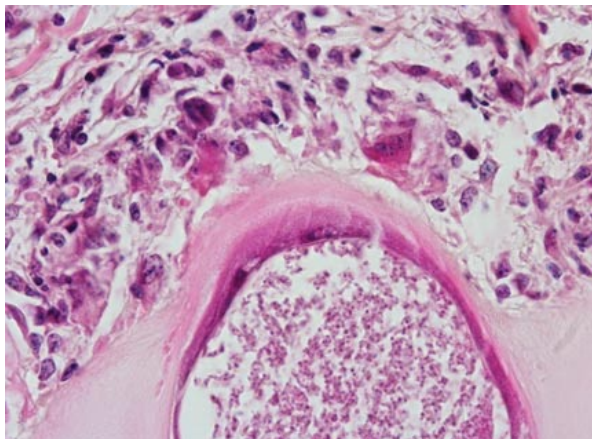
Por outro lado, 5 quistos situavam-se na camada papilar da derme (Figura 1) e 4 (pertencentes a um outro caso) na camada reticular (Figura 2).



**Figura 2** – Conjunto de três quistos de *B. besnoiti* (dois deles cortados tangencialmente, pelo que se distingue apenas o invólucro) localizados na camada reticular da derme. São envolvidos por um infiltrado inflamatório celular abundante. Coloração da hematoxilina-eosina. Objectiva x10.

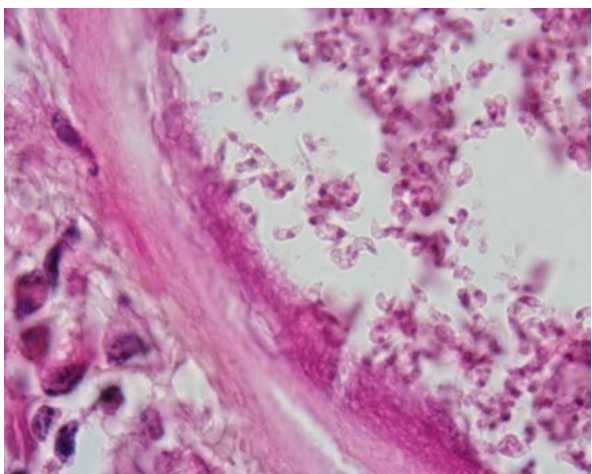
Todos estes quistos apresentavam um invólucro com 2 componentes concêntricos (Figura 3): um externo, espesso, moderadamente eosinófilo e de textura finamente lamelada, e um interno, fino, basófilo onde, por vezes, se notavam alguns núcleos achatados de tama-

no semelhante ao dos núcleos interfásicos das células do hospedeiro.



**Figura 3** – Grande quisto de *B. besnoiti* observado com ampliação maior. Notam-se os dois constituintes do invólucro, correspondendo o interno (basófilo) à célula parasitada, onde se localizam dois núcleos. Coloração da hematoxilina-eosina. Objectiva x40.

Este último componente corresponde à célula parasitada. O interior de cada quisto era um espaço aparentemente vazio onde se localizavam os bradizoítos, alongados, por vezes ligeiramente curvos, de extremidades arredondadas e com núcleo pequeno e basófilo situado próximo de uma das extremidades (Figura 4).

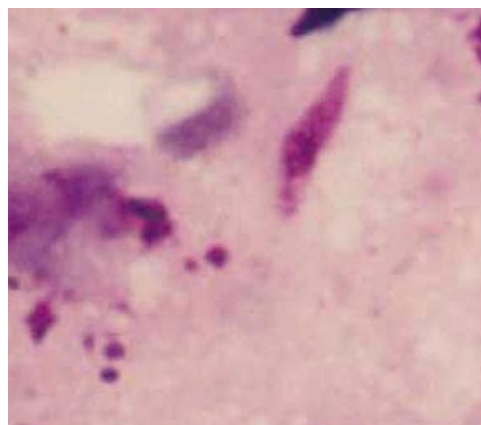


**Figura 4** – Quisto de *B. besnoiti* onde se observa a morfologia dos bradizoítos isolados. Coloração da hematoxilina-eosina. Objectiva x100.

Observava-se um infiltrado inflamatório celular periquístico, ligeiro no caso de 2 quistos (Figura 1), moderado em outros 2 e abundante em 5 quistos (todos estes de uma biopsia – Figura 2). As células constituintes eram predominantemente macrófagos (formando, por vezes, pequenas células gigantes com poucos núcleos), seguidos de linfócitos, granulócitos eosinófilos e, finalmente, de alguns plasmócitos. Em 2 cortes, alguns queratinócitos dos estratos espinhoso e granuloso da epiderme apresentavam-se distendidos por um volumoso vacúolo intracitoplásmico.

As dimensões médias e os respectivos desvios-padrão encontradas foram as seguintes: *i*) Bradizoítos: 4,6 x 1,8  $\mu$ m; *ii*) Eixo maior e menor dos quistos: eixo maior: 182,3  $\pm$  65,3  $\mu$ m; eixo menor: 156,7  $\pm$  53,9  $\mu$ m; *iii*) Espessura da parede dos quistos: 17,9  $\pm$  5,2  $\mu$ m.

Em nenhum dos esfregaços de sangue de cada animal foi observada a ocorrência de merozoítos de *B. besnoiti*. Também não se detectou na conjuntiva de qualquer animal os pequenos nódulos característicos de besnoitiose. Porém, alguns merozoítos de *B. besnoiti* foram detectados em esfregaços da secreção obtida a partir da região periorbital (Figura 5).



**Figura 5** – Merozoíto de *B. besnoiti* contido na secreção lacrimal de um bovino com besnoitiose. Coloração de May-Grünwald-Giemsa. Objectiva x100.

## Discussão

A morfologia e as dimensões das estruturas quísticas detectadas neste estudo assim como a resposta inflamatória nos bovinos com besnoitiose estão de acordo com as observações previamente relatadas para *B. besnoiti* (Ferreira *et al.*, 1982; Ferreira, 1985) em que as dimensões dos bradizoítos são semelhantes às referidas por outros autores (Ferreira, 1985; Sannusi, 1991), embora os seus comprimentos sejam ligeiramente inferiores. Estas corroboram os resultados aqui relatados quanto à ocorrência de cerca de 42% de animais assintomáticos mas comprovadamente portadores de *B. besnoiti* no grupo de uma exploração de Évora, o que dá suporte ao aumento de casos clínicos de besnoitiose em efectivos bovinos no Alentejo, nos últimos 5 anos referido por Caeiro *et al.* (1999) e por Vidal *et al.* (1999). Os prejuízos resultantes poderão ser cada vez mais elevados na medida em que a diminuição da fertilidade nas fêmeas e nos machos têm implicações no rendimento dos efectivos bovinos. Importa também realçar que na década de 80, quando após um interregno de 40 anos se observam novamente casos de besnoitiose, esta parasitose apresentava maior incidência na raça Saller, enquanto actualmente também já ocorrem, pelo menos na região de Évora, casos desta doença nas raças Charolesa,



Limousine e Mertolenga, assim como nos cruzamentos que abundam nas manadas desta região. Deste modo, a detecção de animais assintomáticos, com idade inferior a 2 anos, mas com lesões anatomopatológicas de besnoitiose evidencia uma outra dimensão epidemiológica desta parasitose em que, para além das implicações acima referidas, se torna também preocupante o facto daqueles animais constituírem um foco permanente de disseminação de *B. besnoiti*. Urge portanto, proceder à quantificação e qualificação dos efectivos bovinos assintomáticos, infectados com este protozoário para que melhor se possa avaliar a dimensão epidemiológica da besnoitiose bovina até porque se tem observado uma grande incidência de casos em animais importados. Em Portugal, é possível que este morbo esteja a adquirir um impacto importante devido às importações de efectivos reprodutores que, após a adesão à União Europeia, se têm verificado, tendo como objectivo a introdução de raças com maior aptidão creatopoiética e o aumento da produção dos rebanhos existentes. De tudo isto ressalta que os programas de vigilância epidemiológica são de importância fulcral para uma minimização das consequências que a importação constitui nesta e noutras doenças. Importa assim esclarecer definitivamente se é a importação de animais que introduz a besnoitiose bovina em Portugal, ou se são os animais não previamente expostos ao agente e/ou sem qualquer nível prévio de imunização e imunodeprimidos pelo "stress" do transporte que, em Portugal ao contactarem com *B. besnoiti*, contraem o morbo ou ainda, se são as duas situações que intervêm na epidemiologia deste protozoário no nosso País.

Finalmente, importa também referir que a análise dos casos de besnoitiose bovina aqui relatados indicam uma maior incidência desta parasitose no Verão e início do Outono, o que está de acordo com o observado por outros autores Portugueses (Leitão, 1949) e Sul-Africanos (Bigalke, 1968). Em Portugal, os tabanídeos, quer pela abundância com que surgem no Verão quer pela picadura intermitente, poderão estar implicados na disseminação de *B. besnoiti*.

Na medida em que alguns exemplares deste protozoário foram detectados nos esfregaços obtidos a partir da região periorbital de um bovino com besnoitiose, poder-se-á assim inferir que tabanídeos ou outros insectos (tal como, *Stomoxys calcitrans* também abundante durante o Verão) possam estar envolvidos na transmissão deste protozoário o que, a confirmar-se, implicará a implementação urgente de medidas adequadas para o seu controlo. Consequentemente, encontram-se em progresso estudos para elucidação desta situação e de outras afins, relacionadas com o aparente carácter enzootico desta parasitose.

## Agradecimentos

À Direcção Geral de Veterinária, nas pessoas dos Exmos. Senhores Director, Dr. Francisco do Carmo

Reis, e do Sub-Director, Dr. António Salles Henriques, os autores agradecem penhoradamente pelos apoios e colaborações concedidas que viabilizaram a realização deste trabalho. À Sra. D. Maria do Rosário Luís, funcionária da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa (FMV-UTL), os autores muito agradecem também pela sua eficiente e prestimosa colaboração durante o desenvolvimento deste estudo, nomeadamente na preparação, fixação e coloração de cortes histológicos.

## Bibliografia

- Bigalke, R.D. (1960). Preliminary observations on the mechanical transmission of cyst organisms of *Besnoitia besnoiti* (Marotel, 1912) from a chronically infected bull to rabbits by *Glossina brevipalpis* Newstead, 1910. *J. S. Afr. Vet. Med. Assoc.*, 31: 37-44.
- Bigalke, R.D. (1968). New concepts on the epidemiological features of bovine besnoitiosis as determined by Laboratory and field investigations. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 35: 3-138.
- Bussiéras, J. et Chermette, R. (1992). Abrégé de Parasitologie Vétérinaire. Fascicule II: Protozoologie Vétérinaire. Service de Parasitologie – École Nationale Vétérinaire d'Alfort, Maisons Alfort. pp. 55-56 e 131-132.
- Caeiro, V., Ferreira, M.L. e Branco, S. (1999). Besnoitiose bovina no Alentejo, Portugal. Resumos do congresso. *VI Congresso Ibérico de Parasitologia*, Córdoba, Espanha.
- Dubey, J.P. (1976). A review of Sarcocystis of domestic animals and of other coccidian of cats and dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 169: 1061-1078.
- Ferreira, M.L. (1985). Besnoitiose Bovina. Aspectos Anatómicos. Tipografia Minerva Central: Maputo, R.P. Moçambique. 110 pp.
- Ferreira, M.L. e Diaz, O.H. (1984). Importancia de la besnoitiosis en la fertilidad de los toros. *10<sup>th</sup> International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination*, Illinois.
- Ferreira, M.L., Petisca, J. L.N. e Diaz, O.H. (1982). Alterações testiculares em touros de Moçambique assintomáticos e com sintomas de clínicos de besnoitiose. *Repositório dos Trabalhos do I.N.V.*, XIV: 97-108.
- Franco E., e Borges, I. (1915). Nota sobre a sarcosporidiose bovina. *Revista de Medicina Veterinária*, 165: 255-298 e 166: 287-298.
- Leitão, J.L.S. (1949). Globidiose bovina por globidium besnoiti (Marotel 1912). *Anasarca bovina. Revista de Medicina Veterinária*, 330: 152-158.
- Levine, N.D. (1977). Nomenclature of Sarcocystis in the ox and sheep and on fecal Coccidia of the dog and cat. *J. Parasitol.*, 63: 36-51.
- Rommel, M. (1989). Recent advances in the knowledge of the biology of the cyst-forming coccidian. *Angew Parasitol.*, 30: 173-183.
- Sannusi, A. (1991). A simple field diagnostic smear test for bovine besnoitiosis. *Vet. Parasitol.*, 39: 185-188.
- Soulsby, E.J.L. (1982). Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals. 7<sup>a</sup> edição. Baillière Tindall, Londres. pp. 686-687.
- Vidal, R., Ferreira, M.L., Caeiro, V. Cabral, M.I., Silvestre, A.M., Garcia e Costa, F.J. e Jorge Victor, J.M. (1999). Caracterização genética preliminar da *Besnoitia besnoiti* isolada de tecidos fixados em formalina. Resumos do congresso. *VI Congresso Ibérico de Parasitologia*, Córdoba, Espanha