



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

Medicina de Espécies Zoológicas

Beatriz Alexandra Gomes Coelho dos Santos

Orientação: Prof. Doutora Joana da Costa Reis

Co-Orientação: Dr. Alfredo Gargallo Martín

Mestrado integrado em medicina veterinária

Relatório de estágio

Évora, 2016



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

Medicina de Espécies Zoológicas

Beatriz Alexandra Gomes Coelho dos Santos

Orientação: Prof. Doutora Joana da Costa Reis

Co-Orientação: Dr. Alfredo Gargallo Martín

Mestrado integrado em medicina veterinária

Relatório de estágio

Évora, 2016

Agradecimentos

Primeiramente pretendo agradecer a quem fez de mim o que sou hoje, me formou como pessoa e me inculuiu os valores de respeito, trabalho, amor e amizade, fazendo também com que fosse possível o estudo e conclusão deste curso. Assim sendo agradeço por tudo à minha família por todo o apoio e base sólida fornecido ao longo destes anos. Todos os miminhos e conselhos dos avós, dedicação e visitas dos tios, conversas com o pai e amor de mãe essencial para solucionar até a mais pequena crise existencial. Sinto-me uma sortuda com vocês por perto.

Estes anos permitiram-me aprender a gerir o meu tempo, balanceando entre as coisas que mais gosto de fazer, com quem realmente quero estar e a dar importância aos pequenos momentos com grandes pessoas e... conciliar tudo com os estudos. Certas coisas foram-se perdendo dando lugar a outras novas, mas orgulho-me por ter conseguido manter a minha grande paixão pelo andebol, apesar de quase a 250km de casa, e amizades que se mantiveram e fortaleceram com os anos. Portanto agradeço também às minhas meninas BRRonzeadas por tudo o que já partilhámos, os reencontros aos fins de semana e tudo o que ainda estará para vir.

Aos “bichinhos” que passaram pela minha vida, que me fizeram aprender e compreender a relação que se pode criar com tais seres maravilhosos, considerando-os parte da família, um miminho muito grande e a promessa que vos irei sempre proteger. Meu pequeno Baguera, o teu percurso foi curto mas a tua marca foi enorme.

A vivência pela Muy Ilustre cidade de Évora, para além da formação académica e pestanas queimadas proporcionou-me também grandes momentos, novas amizades e viagens à descoberta de um país. Mas é de todo impossível olhar para estes anos sem me lembrar de algumas pessoas maravilhosas e seus companheiros, que foram essenciais nesse percurso, agradeço do fundo do coração à Miriam, Tânia (Zorba), Daniela, Diogo (Atum), Ivo e Marta por terem feito parte dele e conto com vocês daqui para a frente!

Agradeço também aos professores que me auxiliaram neste percurso, principalmente à professora Joana Reis como minha orientadora, à professora Ludovina Padre pela disponibilidade e auxílio no meu estudo e à engenheira Maria João Vila Viçosa pelo acompanhamento, colaboração e conhecimentos partilhados na área laboratorial de parasitologia.

Desde cedo surgiu a paixão pelos animais e, em especial os animais selvagens, tanto que as manhãs de domingo a ver o BBC Vida Selvagem era considerado o meu horário nobre. O fato de ter tido a possibilidade de contactar com tais maravilhosos animais, perceber os seus comportamentos e trabalhar com eles, foi não só a realização de um sonho mas também a

constatação de um objetivo de vida. Como tal, tenho de agradecer ao Badoca Safari Park pela experiência proporcionada, em especial ao Doutor Alfredo Gargallo pelos ensinamentos, orientação e dedicação demonstrada e ao Doutor João Almeida pela disponibilidade e experiência partilhada. A toda a equipa de tratadores, em especial à Joana Rações pela amizade e companheirismo criado, ao Hélder por não me ter deixado a dormir ao relento e ser um bom colega de casa, contigo aprendi umas belas engenhocas e ri-me até não poder mais, e à Sylvie pela ajuda prestada. Ao Marcos Chinita agradecer parece pouco em comparação a todo o apoio incondicional desde o primeiro dia no parque, tens a capacidade de constantemente melhorar e completar os meus dias através de pequenos pormenores que fazem toda a diferença.

Assim, tendo família, amigos e “bichinhos” de que é que uma pessoa precisa mais para ser feliz?

Resumo

O presente relatório refere-se ao estágio curricular realizado no Badoca Safari Park, no âmbito do mestrado integrado em medicina veterinária da Universidade de Évora, na área de medicina de espécies zoológicas. Este encontra-se dividido em duas partes, uma relativa às atividades realizadas e casuística, acompanhada de aprofundamento teórico, e outra relacionada com a pesquisa de hemoparasitas em ungulados, através de esfregaços sanguíneos, efetuada no decorrer do estágio.

As hemoparasitoses são infeções com potencial zoonótico, transmitidas por vetores, associadas a importantes perdas económicas. O controlo destas afeções tem como obstáculos fatores económicos e sociais, a heterogenicidade de hospedeiros que estes hemoparasitas e respetivos vetores apresentam, assim como o facto das espécies de animais selvagens poderem atuar como hospedeiros reservatórios. A entrada de animais exóticos e saída de autóctones, em zonas endémicas, provoca desequilíbrios na relação entre o parasita e hospedeiro que poderão despoletar episódios de doença.

Palavras-chave: Hemoparasitas; Ungulados; Vetores; Esfregaços sanguíneos; Controlo

Abstract

Zoo and Wildlife medicine

This report refers to the internship held at Badoca Safari Park, as part of the integrated master's degree in veterinary medicine, at the University of Évora, in the clinic area of wild species and wild animals. This thesis is divided into two parts, one on the activities and cases, accompanied by theoretical studies, and the other related to hemoparasites research on ungulates through blood smears, performed during the internship.

The hemoparasitoses are infections with zoonotic potential, transmitted by vectors associated with significant economic losses. The control of these affections has as main obstacles the economic and social factors, the heterogeneity of hosts these hemoparasites and respective vectors present, as well as the fact that the wildlife species can act as reservoir hosts. The entry of exotic animals and the disappearance of natives, in endemic areas, causes imbalances in the relationship between parasite and host that can trigger episodes of illness.

Keywords: Hemoparasites; Ungulates; Vector; Blood smear; Control

Índice

Agradecimentos.....	I
Resumo	III
Abstract	IV
Índice	V
Índice de gráficos	VIII
Índice de tabelas	IX
Índice de figuras	XI
Lista de abreviaturas	XIII
Introdução.....	1
Parte I: Relatório de estágio.....	2
1. Apresentação do local de estágio – Badoca Safari Park	2
1.1 Enquadramento e atividades de rotina.....	3
2. Análise da casuística das atividades desenvolvidas.....	4
2.1 - Medidas preventivas	10
2.1.1. Desparasitação.....	13
2.1.2. Vacinação	14
2.1.2. Contraceção	15
2.1.3. Treino médico.....	16
2.2. Intervenções médicas	18
2.2.1. Colheita de sangue.....	18
2.2.2. Identificação de animais.....	23
2.2.3. Sexagem	23
2.3. Patologia médica	24
2.3.1. Imagiologia	26
2.3.1.1. Radiologia.....	26
2.3.1.2. Ecografia	26
2.3.2. Infeciologia	27
2.3.3. Urologia	28
2.3.4. Gastroenterologia	28
2.3.5. Oftalmologia	28

2.3.6.	Dermatologia	29
2.3.7.	Neurologia	30
2.3.8.	Ortopedia	30
2.3.9.	Ginecologia/ obstetrícia	31
2.4.	Imobilização química	35
2.5.	Intervenções cirúrgicas	40
2.6.	Necrópsias.....	42
2.7.	Transporte de animais.....	43
Parte II: Pesquisa de hemoparasitas em ungulados.....		46
3.	Introdução teórica	46
3.1.	Ungulados	48
3.2.	Vetores	48
3.3.	Tripanosomose.....	51
3.3.1.	Caracterização	51
3.3.2.	Ciclo de vida	52
3.3.3.	Epidemiologia	53
3.3.4.	Sinais clínicos.....	54
3.3.5.	Imunidade	55
3.4.	Theileriose	56
3.4.1.	Caracterização	56
3.4.2.	Ciclo de vida	57
3.4.3.	Epidemiologia	58
3.4.4.	Sinais clínicos.....	60
3.4.5.	Imunidade	61
3.5.	Babesiose.....	62
3.5.1.	Caracterização	62
3.5.2.	Ciclo de vida	62
3.5.3.	Epidemiologia	63
3.5.4.	Sinais clínicos.....	64
3.5.5.	Imunidade	65
3.6.	Anaplasiose.....	66

3.6.1.	Caracterização	66
3.6.2.	Epidemiologia	66
3.6.3.	Ciclo de Vida	67
3.6.4.	Sinais clínicos	68
3.6.5.	Imunidade	69
3.7.	Métodos de diagnóstico de hemoparasitas em ungulados	69
3.7.1.	Observação microscópica	69
3.7.1.1.	<i>Trypanosoma sp.</i>	70
3.7.1.2.	<i>Theileria sp.</i>	70
3.7.1.3.	<i>Babesia sp.</i>	71
3.7.1.4.	<i>Anaplasma sp.</i>	72
3.7.2.	Testes serológicos	72
3.7.3.	Métodos de diagnóstico molecular	73
3.7.4.	Culturas <i>in-vitro</i>	74
3.7.5.	Xenodiagnósticos	74
3.8.	Tratamento e prevenção de hemoparasitoses em ungulados	74
4.	Pesquisa de hemoparasitas em ungulados do Badoca Safari Park	78
4.1.	Materiais e métodos	78
4.2.	Resultados	81
4.3.	Discussão	86
5.	Considerações finais	90
6.	Bibliografia	91
7.	Anexos	100

Índice de gráficos

Gráfico 1 – Coleção de animais aproximada e frequências absolutas dos animais intervencionados nas diferentes classes (Mammalia, Aves e Reptilia). $n=464$, em que n corresponde ao número total da coleção animal.	5
Gráfico 2 – Frequência absoluta do número de mamíferos intervencionados dentro das diferentes ordens (Primates, Perissodactyla, Artiodactyla, Rodentia, Diprodontia e Carnivora). $n=117$, em que n corresponde ao número total de animais intervencionados	7
Gráfico 3 – Frequência absoluta dos animais da classe dos Mammalia, Aves e Reptillia de acordo com a intervenção veterinária realizada. $n=318$, em que n corresponde ao número total de animais intervencionados.....	10
Gráfico 4 – Frequências absolutas das intervenções veterinárias nas diferentes áreas, de acordo com cada classe. $n=40$, em que n corresponde ao número total de intervenções veterinárias nas diferentes áreas.	26
Gráfico 5 – Frequências absolutas das imobilizações químicas realizadas em mamíferos para captura, tranquilização, tratamento ou controlo contraceptivo. $n=57$, em que n corresponde ao número total de imobilizações químicas realizadas.....	37
Gráfico 6 – Frequência absoluta das necrópsias realizadas na classe dos mamíferos e aves. $n=26$, em que n corresponde ao número total de necrópsias realizadas.	42
Gráfico 7 – Frequências absolutas dos animais transportados para o interior e exterior do parque de acordo com as classes dos animais. $n=92$, em que n corresponde ao número total de animais mobilizados	44

Índice de tabelas

Tabela 1 – Coleção de animais estimada de cada classe (Mammalia, Aves e Reptilia), frequências absolutas (Fi) e relativas (Fr) de animais intervencionados do parque e percentagem da coleção animal intervencionada. $n=464$, em que n corresponde ao número total da coleção animal.	4
Tabela 2 – Frequência absoluta (Fi) e relativa (Fr) das ordens (O) e espécies (E) intervencionadas pertencentes à classe Mammalia. $n=117$, em que n corresponde ao número total de animais intervencionados.	6
Tabela 3 – Frequência absoluta e relativa das espécies intervencionadas pertencentes à classe das aves. $n=64$, em que n corresponde ao número total de aves assistidas.	7
Tabela 4 - Frequências absolutas (Fi) e relativas (Fr) das espécies intervencionadas pertencentes à classe dos répteis. $n=1$, em que n corresponde ao número total de répteis assistidos	8
Tabela 5 - Número de animais, frequências relativas (Fr) e absolutas (Fi) de cada classe, nas quais foram aplicadas medidas preventivas, intervenções médicas, cirúrgicas, imobilizações químicas, necrópsias ou transportes. $n=318$, em que n corresponde ao número total de animais assistidos.	9
Tabela 6 – Frequências absolutas (Fi) e relativas (Fr) das medidas preventivas extraordinárias aplicadas. $n=25$, em que n é o número total de animais em que foram aplicadas medidas preventivas extraordinárias.	13
Tabela 7 – Frequência absoluta (Fi) e relativa (Fr) da finalidade das colheitas de sangue realizadas. $n=91$, em que n corresponde ao número total de animais em que foram realizadas colheitas de sangue.	20
Tabela 8 – Frequências absolutas (Fi), relativas (Fr), acumulada (Fr(a)) e finalidade das colheitas de sangue realizadas. $n=91$, em que n corresponde ao número total de colheitas de sangue realizadas.	22
Tabela 9 – Frequências absolutas (Fi) e relativas (Fr) das intervenções veterinárias nas diferentes áreas, de acordo com cada classe. $n=40$, em que n corresponde ao número total das intervenções veterinárias nas diferentes áreas.	25
Tabela 10 – Frequências absolutas (Fi) e relativas (Fr) dos casos desenvolvidos na área da radiologia. $n=4$, em que n corresponde ao número total de exames radiográficos.	26
Tabela 11 – Frequências absolutas (Fi) e relativas (Fr) dos casos desenvolvidos na área da ecografia. $n=2$, em que n corresponde ao número total de exames ecográficos realizados.	27
Tabela 12 – Frequências absolutas (Fi) e relativas (Fr) dos casos desenvolvidos na área da gastroenterologia. $n=6$, em que n corresponde ao número de casos de gastroenterologia.	28
Tabela 13 – Frequências absolutas (Fi) e relativas (Fr) dos casos desenvolvidos na área da dermatologia. $n=12$, em que n corresponde ao número total de casos na área da dermatologia.	29

Tabela 14 – Frequências absolutas (Fi) e relativas (Fr) dos casos desenvolvidos na área de ortopedia. n=7, em que <i>n</i> corresponde ao número total de casos de ortopedia.	30
Tabela 15 – Frequências absolutas (Fi) e relativas (Fr) dos casos desenvolvidos na área da ginecologia e obstetrícia. n=6, em que <i>n</i> corresponde ao número total de casos de ginecologia e obstetrícia.	31
Tabela 16 – Frequências absolutas (Fi) e relativas (Fr) dos casos em que foi necessário realizar imobilização química. n=57, em que <i>n</i> corresponde ao número total de imobilizações químicas realizadas.	39
Tabela 17 – Frequências absolutas (Fi) e relativas (Fr) das intervenções cirúrgicas realizadas. n=3, em que <i>n</i> corresponde ao número total de intervenções cirúrgicas realizadas.	40
Tabela 18 – Frequências absolutas (Fi) e relativas (Fr) das necrópsias realizadas nos animais das diferentes classes. n=26, em que <i>n</i> corresponde ao número total de necrópsias realizadas.	43
Tabela 19 – Frequências absolutas (Fi) e relativas (Fr) do transporte de animais das diferentes classes para o interior do parque. n=18, em que <i>n</i> corresponde ao número de animais transportados para o interior do parque.	44
Tabela 20 – Frequências absolutas (Fi) e relativas (Fr) do transporte de animais das diferentes classes para o exterior do parque. n=74, em que <i>n</i> corresponde ao número de animais transportados para o exterior do parque.	45
Tabela 21 – Hemoparasitoses em ungulados, agente causal e hospedeiro invertebrado preferencial (38; 39)	50
Tabela 22 – Formas identificadas de <i>Theileria</i> e <i>Anaplasma</i> nos esfregaços de sangue observados de ungulados selvagens e domésticos. n=27, em que <i>n</i> corresponde ao número total de formas parasitárias encontradas.	83
Tabela 23 – Registo de dados dos ungulados domésticos em que foram observadas formas parasitárias e resultados obtidos.	84
Tabela 24 - Registo de dados dos ungulados selvagens em que foram observadas formas parasitárias e resultados obtidos.	85
Tabela 25 – Frequências absolutas (Fi) e relativas (Fr) da presença de formas de <i>Theileria</i> e <i>Babesia</i> de acordo com o género. n=59, em que <i>n</i> corresponde ao número total de animais observados.	85

Índice de figuras

Figura 1 - Mapa ilustrativo do Badoca Safari Park e respetiva legenda. (Adaptado de: http://badoca.pt/?page_id=131 , Junho de 2016) (1)	2
Figura 2 – Distribuição de ração no “Safari”	11
Figura 3 – Enriquecimento ambiental em diversas espécies.	12
Figura 4 – Treino de dessensibilização da girafa Kimani (<i>Giraffa camelopardalis rothschild</i>)... ..	18
Figura 5 – Venopunção jugular num muflão (<i>Ammotragus lervia</i>).....	19
Figura 6 – Colheita de sangue na veia femoral num babuíno-sagrado (<i>Papio hamadryas</i>).	20
Figura 7 – Intervenção cirúrgica de ovariectomia numa fêmea de tigre de Bengala(<i>Panthera tigris</i>).....	32
Figura 8 – Hiperplasia endometrial quística numa fêmea de tigre de Bengala(<i>Panthera tigris</i>) após ovariectomia.	33
Figura 9 – Progenitora fazendo o reconhecimento do nado morto após parto distócico.....	34
Figura 10 - Cirurgia ortopédica a uma fêmea de mandril (<i>Mandrillus sphinx</i>), preparação pré-cirúrgica (à esquerda), colocação de parafusos na placa de titânio (à direita).	41
Figura 11 – Ciclo de vida generalizado de <i>Theileria</i> , usando a <i>T. parva</i> como exemplo. (Adaptado de <i>B.J. Mans et al./International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife 4 (2015) 104 – 118</i>) (68)	58
Figura 12 - Forma tripomastigota de <i>T.brucei</i> identificada num grande cudu (<i>Tragelaphus strepsiceros</i>). Ampliação 1000X. (Fonte: Munang'andu, M. H., Siamudaala, V., Munyeme, M., Nambota, A., Mutoloki, S.& Matandiko W. (2010) Trypanosoma brucei Infection in Asymptomatic Greater Kudus (<i>Tragelaphus strepsiceros</i>) on a Game Ranch in Zambia. The Korean Journal of Parasitology. 48(1): 67-69) (42).....	70
Figura 13 – Representação esquemática de formas eritrocitárias de <i>Theileria sp.</i> (à esquerda) e imagem de microscopia ótica de esquizonte (seta) de <i>Theileria sp.</i> num linfócito (à direita). (Adaptado de Guerra, D & Carvalho, L. M. (2012).Hemoparasitoses de Bovinos em Portugal.Albéitar) (38).	71
Figura 14 - Representação esquemática (à esquerda) e imagem de microscopia ótica (à direita) de eritrócitos infetados com <i>B. bovis</i> (pequena babésia). (Adaptado de Guerra, D & Carvalho, L. M. (2012).Hemoparasitoses de Bovinos em Portugal.Albéitar) (38).....	71
Figura 15 - Representação esquemática (à esquerda) e imagem de microscopia ótica (à direita) de eritrócitos infetados com <i>B. bigemina</i> (grande babésia). (Adaptado de Guerra, D & Carvalho, L. M. (2012).Hemoparasitoses de Bovinos em Portugal.Albéitar) (38).....	72
Figura 16 – Representação esquemática de formas eritrocitárias (à esquerda) e imagem de microscopia ótica (à direita) de <i>Anaplasma marginale</i> (setas). (Adaptado de Guerra, D & Carvalho, L. M. (2012).Hemoparasitoses de Bovinos em Portugal.Albéitar) (38).	72
Figura 17 – Maneio médico durante a imobilização química de dois chitais (<i>Axis axis</i>).	79
Figura 18 – Realização de esfregaço sanguíneo no campo, após colheita de sangue periférico de um elande (<i>Taurotragus oryx</i>).....	80

Figura 19 - Ilustração da técnica para realização de esfregaço sanguíneo (Adaptado de http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/studies/sds-page/bloodcytology.html , Junho 2016) (96).	80
Figura 20 – Formas de <i>Theileria</i> (seta) na ampliação X1000. À esquerda num cobo de leite (<i>Kobus leche</i>), à direita num búfalo afro-asiático.	82
Figura 21 - Formas de <i>Anaplasma</i> (seta) na ampliação X1000 num veado ibérico (<i>Cervus elaphus</i>).	82
Figura 22 – Esfregaços sanguíneos de muflões (<i>Ammotragus lervia</i>) na ampliação X1000. À esquerda depois de conservado em tubo com EDTA, à direita realizado diretamente de sangue periférico.	88

Lista de abreviaturas

A - Adulto

ADN - Ácido desoxirribonucleico

ADSLA - Agrupamento de defesa sanitária do litoral alentejano

ATP- Adenosina trifosfato

BIRA-UA - Bureau interafricano de recursos de animais da união africana

CID - Coagulação intravascular disseminada

DMSO- Sulfóxido de dimetilo

EDTA - *Ethylenediamine tetraacetic acid* (ácido etilenodiamino tetra-acético)

ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ensaio de imunoabsorção enzimática)

FCL – Febre da costa leste

FSH - Hormona folículo-estimulante

GnRH – *Gonadotropin-releasing hormone* (Hormona libertadora de gonadotrofinas)

IFAT – *Immunofluorescence antibody test* (teste de imunofluorescência de anticorpo)

IM- Intramuscular

ISIS - *International species information system* (Sistema de informação de espécies internacionais)

IU – Intrauterina

IV- Intravenosa

LH – Hormona luteinizante

MQB – protocolo anestésico com medetomidina, quetamina e butorfanol

ARN - Ácido ribonucleico

SC – Subcutânea

SA – Sub-adulto

OIE – Organização mundial da saúde animal

PCR - *Polymerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase)

PCR-RT - Reação em cadeia da polimerase por transcriptase reversa

qPCR - Reação em cadeia da polimerase em tempo real

SP- Sangue periférico

Introdução

O presente relatório é referente ao estágio curricular realizado no âmbito do mestrado integrado em medicina veterinária da Universidade de Évora, na área de clínica de animais selvagens e espécies silvestres. O estágio curricular decorreu no Badoca Safari Park, em Vila Nova de Santo André e teve como objetivo proporcionar à autora o contacto com a medicina em animais zoológicos e complementação das competências adquiridas durante o curso, não só clínicas como também logísticas associadas ao trabalho do médico veterinário. O período de estágio consistiu em cinco meses em estágio curricular, com início a um de dezembro e término no dia um de maio de 2016.

O relatório em questão é constituído, numa primeira parte, por uma breve introdução e apresentação do local de estágio, seguida da descrição estruturada das atividades desenvolvidas, acompanhada de aprofundamento teórico. Numa segunda parte, é desenvolvida uma revisão bibliográfica complementar da pesquisa realizada pela autora, durante o estágio, sobre a incidência de hemoparasitas em ungulados no Badoca Safari Park, através da obtenção de esfregaços sanguíneos, onde são expostos e analisados os resultados obtidos.

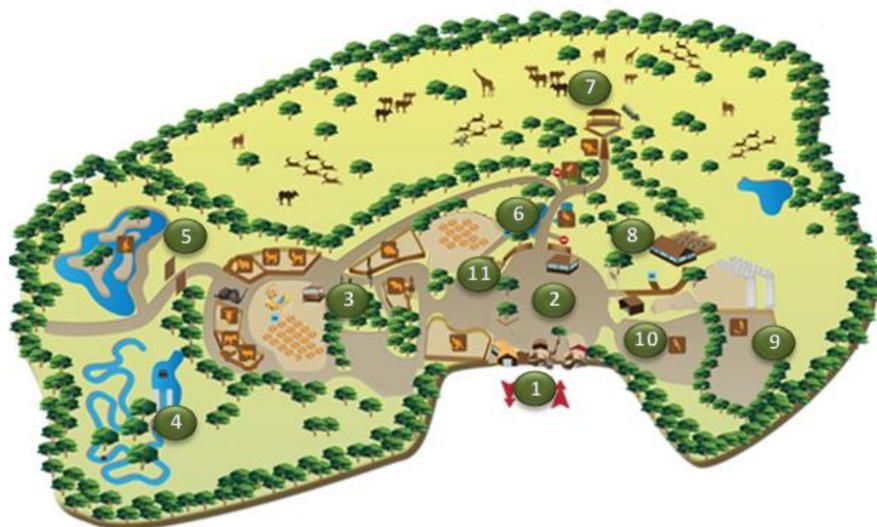
As fotografias presentes ao longo do relatório são fotografias originais captadas durante o período de estágio no Badoca Safari Park.

Parte I: Relatório de estágio

1. Apresentação do local de estágio – Badoca Safari Park

O Badoca Safari Park é um parque zoológico situado em Portugal, mais concretamente em Vila Nova de Santo André, conselho de Santiago do Cacém e que ocupa uma área de 90 hectares. A sua coleção zoológica é de aproximadamente 75 espécies, tendo cerca de 450 animais.

No que diz respeito à organização do parque, este encontra-se dividido em quatro departamentos. O departamento de manutenção é responsável pela manutenção e reparação dos equipamentos e instalações do parque e inclui também os guias do safari. O departamento turístico-pedagógico que atua no escritório, bilheteira e loja, está associado ao *marketing* e gestão do parque. A restauração direcionada principalmente para os visitantes, fornece também as refeições para os funcionários do parque. O departamento animal é responsável por todas as questões relacionadas diretamente com os animais, as quais serão explicitadas no presente relatório. Neste departamento estão incluídos os tratadores, o médico veterinário e o grupo de falcoeiros que atua principalmente na zona da falcoaria, realizando também a sessão de apresentação de aves de rapina.



Legenda:

- | | |
|--------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|
| 1 – Entrada | 6 – Ilha dos lémures |
| 2 – Praça Central | 7 – Safari |
| 3 – Zona de Piquenique/Aldeia Africana/Quinta pedagógica/Parque Infantil | 8 – Restaurante |
| 4 – Rafting | 9 – Demonstração de aves de rapina |
| 5 – Ilha dos grandes primatas | 10 – Jardim de aves exóticas |
| | 11 – Floresta tropical |

Figura 1 - Mapa ilustrativo do Badoca Safari Park e respetiva legenda. (Adaptado de: http://badoca.pt/?page_id=131, Junho de 2016) (1)

Para uma melhor organização e funcionalidade do parque e do departamento animal os animais encontram-se distribuídos por quatro zonas de trabalho que são possíveis de identificar no mapa da Figura 1: uma primeira zona corresponde à “Ilha dos grandes primatas” (5) onde existem três ilhas unidas ao centro albergando três grupos distintos de primatas, uma família de chimpanzés, um grupo de babuínos e outro de mandris; a segunda zona corresponde ao “Passeio pedestre” (3) e inclui a “Quintinha” onde se podem encontrar cavalos, burros, cabras, ovelhas anãs, galinhas, faisões e fracos, a zona dos répteis com as tartarugas e os caimões, a “Ilha dos lémures” (6), a “Floresta tropical” (11) com as araras, mutuns e porquinhos-da-Índia, o parque das emas e dos cangurus de *Bennet*, a instalação dos sitatungas, o “Jardim de aves exóticas” (10) e o lago dos flamingos onde se encontram diversas aves exóticas; a falcoaria onde estão as aves de rapina corresponde a uma terceira zona; a quarta zona consiste no “Safari” (7), este ocupa a maior parte do parque e que marca a diferença dos outros parques do país, já que proporciona aos visitantes a experiência de um safari africano onde poderão ver girafas, zebras, gnus, búfalos, órix, cabras de leque, muflões, tigres, entre muitos outros.

1.1 Enquadramento e atividades de rotina

Todos os animais mantidos em cativeiro devem ser tratados com respeito e providos de água potável, alimentação nutritiva, correto maneio, cuidados de saúde num ambiente apropriado (2). Sensações como medo, dor, sofrimento e *stress* devem ser minimizadas (2). É incumbida à pessoa que assume a responsabilidade de realizar o maneio, quer de animais domésticos ou animais selvagens mantidos em cativeiro, a preocupação e controlo do bem-estar animal.

O bem-estar animal consiste na manutenção do ser vivo em ótimo estado de saúde (física e mental) associado à minimização de fatores de *stress*. Os critérios para avaliação do estado de saúde do animal incluem peso apropriado, apetite associado a uma correta alimentação, funções fisiológicas normais (comportamento, defecação e micção) e um normal ciclo de vida (2). Para que esta análise seja feita corretamente é necessário um conhecimento prévio da biologia dos animais, comportamentos naturais e a vida no seu *habitat* normal (2) .

Esta função cabe aos tratadores do parque, dado que estes são os responsáveis pela alimentação, maneio, observação dos animais e limpeza de instalações, sendo assim os primeiros a detetar alterações nos seus comportamentos que poderão ser indicativas de alguma afeção e necessitar posterior intervenção do médico veterinário. Portanto pode-se dizer que os tratadores são “os olhos do médico veterinário”, sendo necessário um bom trabalho de equipa e colaboração entre todos os elementos do departamento animal.

É muito importante o acompanhamento dos tratadores para uma maior perceção dos comportamentos, hábitos alimentares e rotinas de cada espécie animal. Esta foi então a base

do trabalho diário realizado, mas sempre que surgia alguma atividade ou intervenção do médico veterinário era feito o acompanhamento do trabalho deste.

Neste contexto de parque zoológico, a função do médico veterinário não se cinge apenas a intervenções clínicas, pois este também é responsável pelo departamento animal, tendo a função de gerir a coleção zoológica e algumas funções de logística, nomeadamente encomenda de materiais, rações e registo de animais em plataformas informáticas como a ISIS (*International species information system*). Como tal, foi realizado o acompanhamento e auxílio na contagem e registo de animais nas diversas plataformas.

2. Análise da casuística das atividades desenvolvidas

Durante o período de estágio a população total do parque foi sofrendo alterações, seja por nascimentos ou mortes ocorridas, como saídas ou entradas dos animais do parque. Tendo em consideração essas alterações, na Tabela 1 é apresentada a contagem aproximada de animais presentes no parque durante o período de estágio, efectuada na sua maior parte no dia cinco de Janeiro de 2016 (data prévia ao início do estudo de pesquisa de hemoparasitas realizado pela autora). A contagem foi adaptada consoante as intervenções realizadas durante todo o estágio, sendo que foram intervencionados no total 182 animais, o que corresponde a 39,22% da coleção animal. A classe Mammalia foi a que apresentou mais animais intervencionados, com 117 animais, seguida da das Aves com 64 animais e Reptilia com apenas uma intervenção.

Tabela 1 – Coleção de animais estimada de cada classe (Mammalia, Aves e Reptilia), frequências absolutas (Fi) e relativas (Fr) de animais intervencionados do parque e percentagem da coleção animal intervencionada. $n=464$, em que n corresponde ao número total da coleção animal.

Classe	Coleção animal (≈)	Animais intervencionados		% da coleção animal intervencionada
		Fi	Fr	
Mammalia	307	117	63,93%	38,11%
Aves	149	64	35,16%	42,95%
Reptilia	8	1	0,55%	12,50%
Total	464	182	100,00%	39,22%

O Gráfico 1 permite comparar em termos absolutos o número de animais, dentro de cada classe, da coleção animal estimada com o número de animais intervencionados. Sendo que na classe Mammalia foram intervencionados 117 dos 307 animais, nas Aves foram 64 de

um total de 149 e na classe Reptilia foi um num total de oito animais. Em termos percentuais foram assistidos 63,93% dos mamíferos, 35,16% das aves e 0,55% dos répteis.

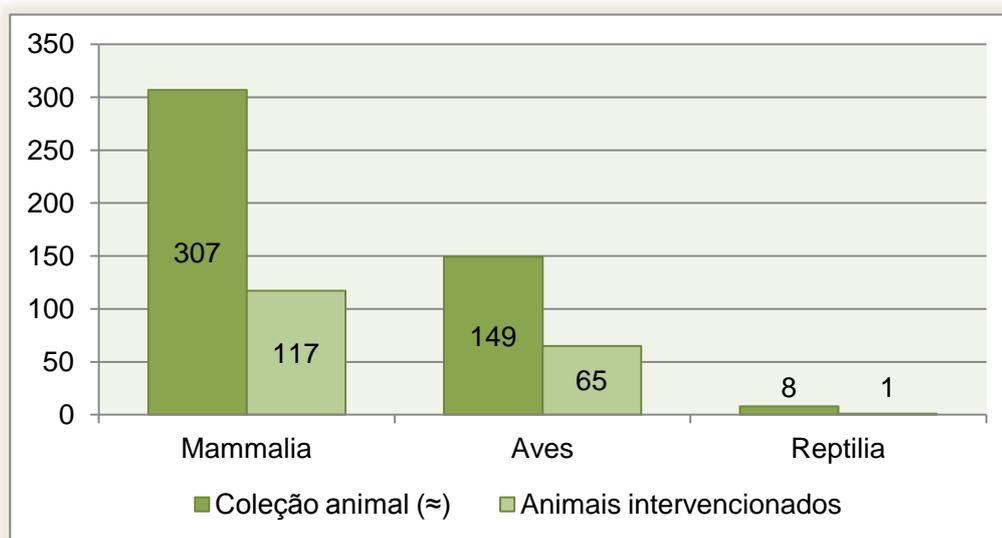


Gráfico 1 – Coleção de animais aproximada e frequências absolutas dos animais intervencionados nas diferentes classes (Mammalia, Aves e Reptilia). $n=464$, em que n corresponde ao número total da coleção animal.

Para a realização de uma análise generalizada dos 117 mamíferos intervencionados, na Tabela 2, as espécies de mamíferos foram agrupadas dentro das suas ordens. De tal forma que no Gráfico 2 se pode constatar que foi na ordem Artiodactyla que se realizaram mais observações, nomeadamente 73, o que corresponde a 62,39% dos mamíferos. Ainda dentro desta ordem há que realçar as duas espécies em maior casuística, os muflões (*Ammotragus lervia*) com 16 animais e as cabras anãs (*Capra aegragus hircus*) com 13. De seguida, verifica-se que a ordem com mais exemplares é a Primates com 20 animais (17,09%), com maior destaque para os lémures de cauda anelada (*Lemur catta*) com 14 animais intervencionados. Dentro dos Perissodactyla foram observados nove animais, salientando os cinco asininos (*Equus asinus*), enquanto que, na Carnivora foram apenas sete, onde se incluem as duas fêmeas de tigres de Bengala (*Panthera tigris*). Com menor casuística associada aparece a ordem Rodentia com seis porquinhos-da-Índia (*Cavia porcellus*) e a Diprotodontia com dois cangurus de Bennet (*Macropus rufogriseus*).

Tabela 2 – Frequência absoluta (Fi) e relativa (Fr) das ordens (O) e espécies (E) intervencionadas pertencentes à classe Mammalia. n=117, em que *n* corresponde ao número total de animais intervencionados.

Mammalia						
Ordem	Espécie	Nome comum	Fi (E)	Fr (E)	Fi (O)	Fr (O)
Primates	<i>Lemur catta</i>	Lémur de cauda anelada	14	11,97%	20	17,09%
	<i>Mandrillus sphinx</i>	Mandril	3	2,56%		
	<i>Papio hamadryas</i>	Babuíno-sagrado	3	2,56%		
Perissodactyla	<i>Equus caballus</i>	Cavalo	2	1,71%	9	7,69%
	<i>Equus asinus</i>	Burro/asinino	5	4,27%		
	<i>Equus ferus caballus</i>	Pónei de <i>Shetland</i>	2	1,71%		
Artiodactyla	<i>Ovis aries</i>	Ovelha anã	2	1,71%	73	62,39%
	<i>Capra aegragus hircus</i>	Cabra anã	13	11,11%		
	<i>Capra girgentana</i>	Cabra girgentana	3	2,56%		
	<i>Phacochoerus africanus</i>	Facoqueiro africano	1	0,85%		
	<i>Giraffa camelopardalis rothschild</i>	Girafa <i>Rothschild</i>	1	0,85%		
	<i>Taurotragus oryx</i>	Elande	2	1,71%		
	<i>Tragelaphus spekii</i>	Sitatunga	4	3,42%		
	Búfalo afro-asiático	Búfalo Afro- Asiático	5	4,27%		
	<i>Syncerus caffer nanus</i>	Búfalo do Congo	1	0,85%		
	<i>Kobus leche</i>	Cobo de leche	6	5,13%		
	<i>Connochaetes taurinus</i>	Gnu Azul	2	1,71%		
	<i>Oryx dammah</i>	Órix de Cimitarra	5	4,27%		
	<i>Axis axis</i>	Chital	8	6,84%		
	<i>Cervus elaphus hispanicus</i>	Veado Ibérico	2	1,71%		
	<i>Camelus dromedarius</i>	Dromedário	2	1,71%		
<i>Ammotragus lervia</i>	Muflão	16	13,68%			
Rodentia	<i>Cavia porcellus</i>	Porquinho-da- Índia	6	5,13%	6	5,13%
Diprotodontia	<i>Macropus rufogriseus</i>	Canguru de <i>Bennett</i>	2	1,71%	2	1,71%
Carnivora	<i>Nasua nasua</i>	Coati	1	0,85%	7	5,98%

<i>Canis lupus familiaris</i>	Cão	4	3,42%		
<i>Panthera tigris</i>	Tigre de Bengala	2	1,71%		
Total		117	100,00%	117	100,00%

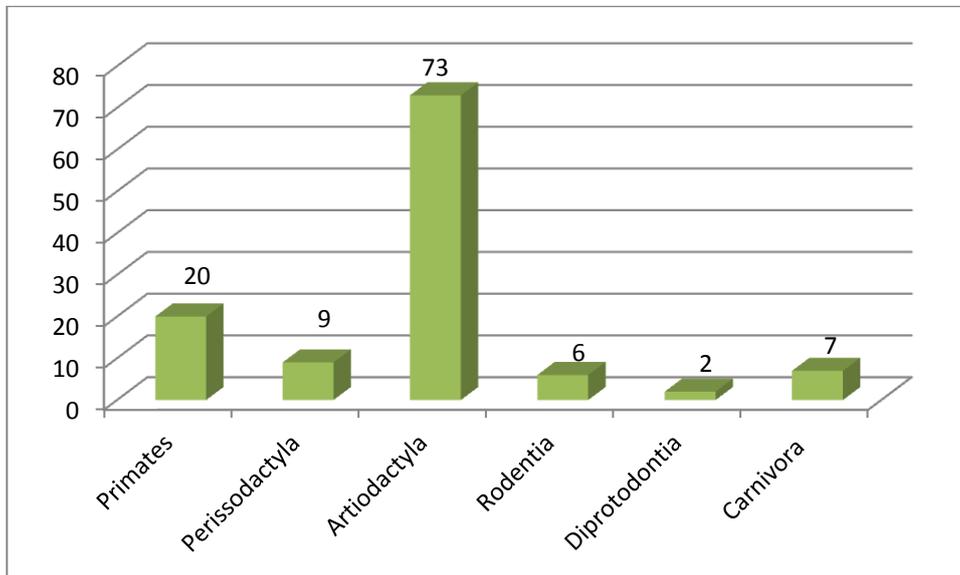


Gráfico 2 – Frequência absoluta do número de mamíferos intervencionados dentro das diferentes ordens (Primates, Perissodactyla, Artiodactyla, Rodentia, Diprotodontia e Carnivora). n=117, em que n corresponde ao número total de animais intervencionados

Na classe das aves, a abordagem é feita apenas por espécies num total de 64 animais. Assim, como demonstra a Tabela 3, a espécie de aves com mais casuística durante o período de estágio pertence ao género *Agapornis* com 22 exemplares, ou seja 34%, seguida das avestruzes (*Strutio camelus*) com 11 casos, 17%, e galinhas de Angola (*Numida meleagris*) na percentagem de 13% representando oito aves.

Tabela 3 – Frequência absoluta e relativa das espécies intervencionadas pertencentes à classe das aves. n=64, em que n corresponde ao número total de aves assistidas.

Aves			
Espécie	Nome Comum	Fi	Fr
<i>Strutio camelus</i>	Avestruz	11	17%
<i>Cathartes aura</i>	Urubu de cabeça vermelha	1	2%
<i>Leptoptilos crumeniferus</i>	Marabu	1	2%
<i>Buteo buteo</i>	Águia de asa redonda	1	2%
<i>Strix aluco</i>	Coruja do Mato	1	2%
<i>Numida meleagris</i>	Galinha de Angola	8	13%

<i>Agapornis sp.</i>	Inseparáveis	22	34%
<i>Trichoglossus haematodus</i>	Lóris arco-íris	2	3%
<i>Lamprolornis superbus</i>	Melro metálico	2	3%
<i>Psittacula krameri</i>	Periquito rabo de junco	2	3%
<i>Tauraco sp.</i>	Turaco	7	11%
<i>Phoeniconaias minor</i>	Flamingo pequeno	1	2%
<i>Crax rubra</i>	Mutum	2	3%
<i>Chrysolophus pictus</i>	Faisão dourado	3	5%
Total		64	100%

Como demonstra a Tabela 4, a única espécie intervencionada pertencente à classe Reptilia consiste num exemplar da espécie tartaruga de esporas africana (*Centrochelys sulcata*).

Tabela 4 - Frequências absolutas (Fi) e relativas (Fr) das espécies intervencionadas pertencentes à classe dos répteis. $n=1$, em que n corresponde ao número total de répteis assistidos

Reptilia			
Espécie	Nome comum	Fi	Fr
<i>Centrochelys sulcata</i>	Tartaruga de esporas africana	1	100%

No contexto de intervenções veterinárias, temos ações rotineiras que envolvem medidas preventivas e ações extraordinárias desenvolvidas quando algum animal se encontra debilitado e necessita de intervenção médica, podendo ser necessário realizar uma imobilização química ou até mesmo intervenção cirúrgica. Por vezes, o diagnóstico de uma patologia só é feito *post-mortem* aquando da realização da necrópsia, sendo sempre importante a realização da mesma independentemente da causa da morte. O médico veterinário também intervém quando é necessário realizar transporte de animais, seja para o interior ou exterior do parque. Assim, como demonstra a Tabela 5, foi feita a divisão das intervenções veterinárias de acordo com o tipo de intervenção realizada.

Primeiramente é possível verificar que a frequência absoluta de animais sujeitos a intervenções veterinárias, 318, é superior ao número total de animais intervencionados, 183, referidos na Tabela 1. Tal discrepância deve-se ao facto de um mesmo animal poder ser sujeito a diversas intervenções veterinárias, em diferentes situações, sendo cada uma contabilizada de forma diferente na Tabela 5. No entanto, na Tabela 1 é feita a referência ao animal

intervencionado como unidade absoluta e não como caso clínico, não ocorrendo qualquer repetição de animais na contagem.

Por sua vez, analisando a Tabela 5, conclui-se que as intervenções veterinárias foram na sua maioria intervenções médicas, cerca de 36,16%, seguida da realização de transporte de animais com 28,93%. Nesta análise deve-se ter em conta que as medidas preventivas estão referidas como “extraordinárias” pois nesta contabilização não foram incluídas desparasitações e coprologias que serão referidas mais adiante por na sua maioria englobarem todos os animais do parque. Nesta tabela, as medidas preventivas extraordinárias representam 7,86% das ações e incluem vacinações, medidas contraceptivas e treino de animais.

Tabela 5- Número de animais, frequências relativas (Fr) e absolutas (Fi) de cada classe, nas quais foram aplicadas medidas preventivas, intervenções médicas, cirúrgicas, imobilizações químicas, necrópsias ou transportes. $n=318$, em que n corresponde ao número total de animais assistidos.

Intervenções veterinárias	Mammalia	Aves	Reptilia	Fi	Fr
Medidas preventivas extraordinárias	25	0	0	25	7,86%
Intervenções médicas	95	20	0	115	36,16%
Imobilizações químicas	57	0	0	57	17,92%
Intervenções cirúrgicas	3	0	0	3	0,94%
Necrópsias	21	5	0	26	8,18%
Transportes	39	52	1	92	28,93%
Fi	240	77	1	318	100,00%
Fr	75,47%	24,21%	0,31%	100,00%	

O Gráfico 3 permite fazer uma análise perante as frequências absolutas dos animais observados, em que, para além da classe Mammalia se apresentar com o maior casuística, 240, 95 destes corresponderam a intervenções médicas, 57 a imobilizações químicas e 39 a transporte de animais, tendo ocorrido apenas três intervenções cirúrgicas. Na classe das Aves foram intervencionados 77 animais, 52 associados a transporte de animais, 20 definidos como casos clínicos e cinco necrópsias. Nos répteis foi registado um caso relacionado com transporte.

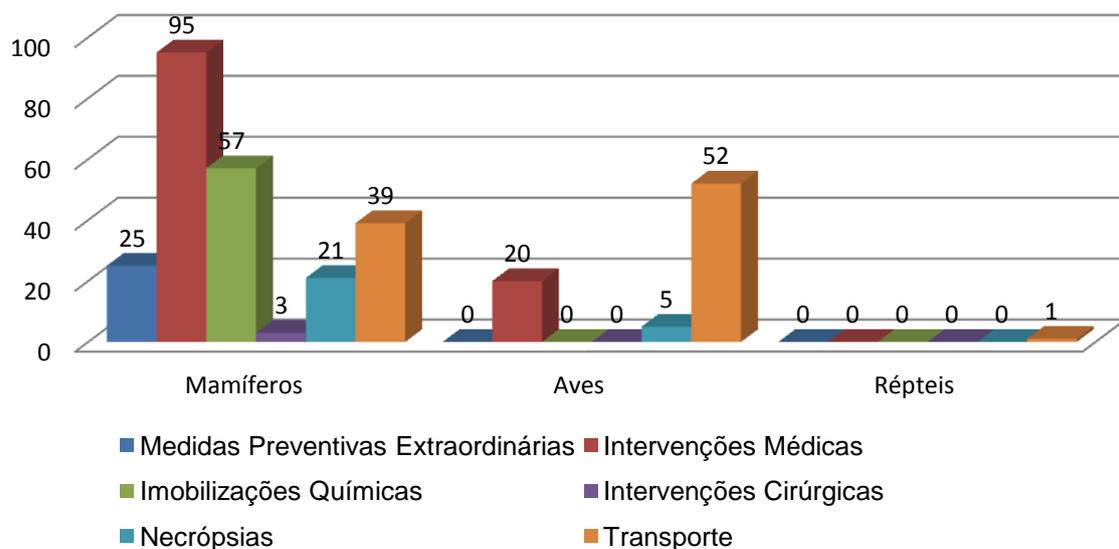


Gráfico 3 – Frequência absoluta dos animais da classe dos Mammalia, Aves e Reptillia de acordo com a intervenção veterinária realizada. $n=318$, em que n corresponde ao número total de animais intervencionados.

2.1 - Medidas preventivas

De uma forma geral, os parques zoológicos satisfazem as necessidades básicas aos animais, como comida de qualidade, cuidados médicos, um local seguro com ambiente naturalista e contacto social apropriado (3). Como indicadores de sucesso da qualidade de vida dos animais pode-se analisar a longevidade e capacidade reprodutiva das espécies (3). Transcendendo todos estes cuidados, deve também ser feita uma observação rotineira dos animais selvagens em cativeiro e aplicação de medidas preventivas.

A implementação de medidas preventivas deve ser a base do maneiio dos animais em parques zoológicos. Apesar de se encontrarem em cativeiro continuam a ser animais selvagens e o objeto dos parques, como o Badoca Safari Park, é minimizar ao máximo o contacto com o Homem e, na maioria das vezes, para que seja feito um correto exame físico é necessário recorrer a contenção física ou química. Acrescentando o facto de estes animais não manifestarem a dor de forma visível, principalmente espécies que são predadas no seu habitat natural e, como tal os sinais clínicos muitas vezes surgem apenas em fases avançadas da doença ou *post-mortem*. A medicina preventiva é, portanto, um conjunto de medidas e ações que visa prevenir possíveis afeções, perigos ou contágios. Para uma correta manutenção de coleções zoológicas devem ser instituídos protocolos de medicina preventiva bem definidos, os

quais devem incluir quarentena de animais, rastreio regular de doenças, vacinação, saneamento e controlo parasitário (4).

De facto, são aplicados diariamente cuidados preventivos no trabalho dos tratadores, nomeadamente no maneio dos animais, entradas e saídas de instalações e alimentação, ou seja, alturas críticas onde os animais podem entrar em conflito por disputas de território e alimento. Por exemplo, a alimentação dos animais do “Safari” é feita duas vezes por dia e consiste na formação de três “linhas” de ração, em que cada uma corresponde a uma saca de ração de 30Kg, por três zonas diferentes do recinto, permitindo assim que um maior número de animais tenha acesso à ração ao mesmo tempo, diminuindo os conflitos (Figura 2). Outras medidas são, por exemplo, o corte de cascos nos ungulados do passeio pedestre (cabras, ovelha, burros, cavalos e pôneis de *Shetland*).



Figura 2 – Distribuição de ração no “Safari”

No contexto geral em parques zoológicos, os animais encontram-se espacialmente limitados num ambiente comparável com o seu habitat natural, não existindo predadores ou presas. Os grupos sociais e os seus constituintes são limitados, não havendo, por vezes, diversidade de espécies presentes e a sua dieta é fixa, oferecida e rotineira. Atualmente, a maioria dos parques disponibiliza ao animal, para este dispender a maior parte do seu tempo, áreas demasiado pequenas e mais estéreis do que os espaços de exibição para o visitante (3). Todos estes fatores fazem com o que o animal tenha pouco controlo na sua vida, o que pode resultar em consequências negativas como desinteresse e comportamentos estereotipados (3). Por sua vez, estes tipos de comportamentos estão associados a um conjunto de atitudes negativas e repetitivas, causadas por ambientes artificiais que não permitem ao animal expressar o seu comportamento natural (5). De facto, essas estereotipias podem ser difíceis de retroceder (5). No entanto, outro fator importante na maneira como um animal em cativeiro interage com o ambiente é a relação com os humanos, por exemplo, a forma com que o animal recebe os humanos pode afetar o seu comportamento de uma forma geral (6).

Contudo, existe um défice de publicações sobre enriquecimento ambiental e pesquisa de estereotipias na maioria das espécies zoológicas, estando muitas vezes focadas em

espécies carismáticas e/ou ameaçadas de perigo de extinção, não existindo porém, uma conclusão sobre uma maior prevalência de casos nesses animais (7).

No Badoça Safari Park, são realizadas regularmente atividades de enriquecimento ambiental, que tal como o nome indica se baseiam no enriquecimento e diversificação das instalações onde os animais se encontram, através da estimulação dos seus comportamentos naturais com algo de que o animal necessita mas que não estava presente anteriormente (7; 8). É um processo dinâmico, em que mudanças nas estruturas e rotinas são realizadas para aumentar as opções comportamentais e capacidades dos animais promovendo o bem-estar animal (8). Em alguns casos este procedimento pode ser utilizado com o objetivo de contrariar comportamentos estereotipados, a longo prazo os reflexos do melhoramento da função biológica podem incluir também sucesso reprodutivo, melhoria da condição física e sanidade (7; 9). Dentro dos diversos procedimentos de enriquecimento executados, a Figura 3 demonstra a ação realizada de alusão ao *Halloween*, no dia um de novembro, em que foram ornamentadas e fornecidas abóboras recheadas de acordo com as preferências de cada espécie. Esta atividade estimulou a capacidade de cada animal reagir a algo diferente, associar a alimento e descobrir métodos de obtenção da sua refeição.



Figura 3 – Enriquecimento ambiental em diversas espécies.

Há certas medidas preventivas veterinárias que são efetuadas por rotina em todos os animais do parque, não sendo por isso contabilizadas como intervenções veterinárias no

relatório do estágio curricular, pois caso fossem contabilizadas iriam inflacionar os resultados da casuística em questão, sendo estas as análises coprológicas e desparasitações. As restantes medidas apresentam-se na Tabela 6 classificadas como medidas preventivas extraordinárias.

De acordo com a Tabela 6, estes procedimentos foram apenas aplicados em mamíferos, correspondendo 72% a casos de vacinação, 24% a aplicação de métodos contraceptivos e apenas 4% a treino médico numa girafa fêmea (*Giraffa camelopardalis rothschild*).

Tabela 6 – Frequências absolutas (Fi) e relativas (Fr) das medidas preventivas extraordinárias aplicadas. n=25, em que n é o número total de animais em que foram aplicadas medidas preventivas extraordinárias.

Medidas Preventivas extraordinárias	Mamíferos								Fi	Fr
	<i>Lemur catta</i>	<i>Mandrillus sphinx</i>	<i>Papio hamadryas</i>	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Panthera tigris</i>	<i>Giraffa camelopardalis rothschild</i>	<i>Tragelaphus spekii</i>			
Vacinações	14			1			3	18	72,00%	
Contraceção		3	2		1			6	24,00%	
Treino médico						1		1	4,00%	
Fi	14	3	2	1	1	1	3	25	100,00%	
Fr	56,00%	12,00%	8,00%	4,00%	4,00%	4,00%	12,00%	100,00%		

2.1.1. Desparasitação

Quanto à prevenção de infeções parasitárias, as desparasitações internas devem ser feitas quando necessário, regularmente, mas de forma direcionada. Para tal, antes de qualquer desparasitação é feita a análise coprológica para selecionar o desparasitante mais indicado. Assim, cerca de duas vezes por ano são feitas análises às fezes dos animais do parque. Normalmente, a desparasitação dos carnívoros (tigres, suricatas e coatis) é feita com praziquantel, pamoato de pirantel e febendazol (ex. comprimidos de Praziquan®) veiculados na alimentação. No caso dos primatas, aves e répteis é administrada na comida febendazol. No caso dos animais da zona do safari, as análises coprológicas não são tão frequentes. Sendo assim, nestes animais a desparasitação é feita de forma regular em duas épocas do ano, através da distribuição de ração medicada fabricada especificamente para o parque. Nos meses de outubro, novembro e dezembro é feita a desparasitação interna com flubendazol, e

nos meses de julho e agosto o princípio ativo é ivermectina, para combater os parasitas externos. No caso dos equídeos é feita a desparasitação contra parasitas gastrointestinais com, por exemplo, ivermectina (Eqvalan®), numa pasta administrada com a ração.

Por norma, sempre que é realizada uma captura de um ruminante do parque, para além da verificação da identificação electrónica e administração de vitamina E e selénio, aproveita-se também para proceder à desparasitação com ivermectina SC na dose de 1ml/40Kg.

2.1.2. Vacinação

No Badoça Safari Park é realizada uma sessão de interação com os lémures, na qual o tratador responsável, após uma prévia sessão de alimentação, coloca fruta nas mãos dos visitantes e, de seguida, os lémures aproximam-se para se alimentar. Como tal, é necessário realizar procedimentos preventivos caso haja alguma mordida por parte dos lémures a um visitante. Assim, anualmente é feita a vacinação de todos os 14 mamíferos da espécie *Lemur catta* contra a raiva (Rabigen®), como demonstra a Tabela 6.

A vacinação dos ruminantes selvagens presentes no “Safari” deve ter como base o conhecimento do risco de doença e a suscetibilidade de cada espécie (4). Como se tratam maioritariamente de espécies africanas, as variações climáticas características de um clima mediterrânico, predispõem ao aparecimento de quadros de enterotoxémias (4).

As enterotoxémias por clostridiose são provocadas por *Clostridium perfringens* tipo D, e surgem por transmissão feco-oral, associada a pastagens sobrelotadas. São desencadeadas por alteração na dieta, especialmente por passagem de um défice nutritivo para excesso (4). A virulência de *Clostridium perfringens* está associada à capacidade de produção de toxinas (10). Esta bactéria desencadeia um quadro de enterite e enterotoxémia, podendo resultar em morte súbita ou num quadro hiperagudo, com depressão profunda, colapso e morte (4; 10). O diagnóstico é feito com base na história e sinais clínicos. Na necrópsia as carcaças para além de sofrerem uma rápida deterioração, apresentam líquido “cor de palha” nas cavidades corporais e rins pulposos (4). A prevenção é feita pela redução da densidade populacional por pastagem e realização de pousio nas que se encontrem contaminadas. Devem também ser evitadas mudanças bruscas na dieta e ponderar a administração da vacina multivalente para clostridioses (Covexin 8®) (4). Logo, no seguimento da necessidade de vacinação de ruminantes selvagens, foi realizada a vacinação com Covexin 8® em três animais da espécie *Tragelaphus spekii*, como demonstra a Tabela 6, aquando de um processo de captura. É necessário ter em consideração que as vacinas vivas devem ser usadas com precaução em ruminantes selvagens, sendo preferenciais as de vacinas mortas (4).

De facto, é preciso também ter em conta que, ao contrário dos anti-helmínticos que podem ser administrados oralmente, as vacinas têm de ser injetadas em contacto com o animal ou através de dardos, o que faz com que sejam essenciais um correto maneoio, métodos de contenção e experiência do operador.

Em relação aos restantes animais do parque deve ser aplicada a vacina contra a gripe equina e tétano nos equídeos, nos tigres contra a raiva, panleucopénia felina, calicivírus e herpesvírus e nas aves contra a pseudotuberculose aviária (4).

2.1.2. Contraceção

O conceito que os zcos servem como uma arca coletiva para salvar espécies em perigo de extinção tem evoluído nos últimos dez anos para uma visão mais holística. As espécies em cativeiro encontram-se livres da maioria dos fatores (disponibilidade de alimento, predadores, doenças ou parasitas) que regulam o crescimento populacional nos seus homólogos em estado selvagem (11). Esta inevitável realidade coloca a responsabilidade e a decisão do controlo populacional diretamente nos gestores da coleção animal e administração dos parques zoológicos. Em consequência, a forma como é feito o controlo populacional envolve questões práticas, filosóficas e éticas. As principais opções disponíveis para os gestores da coleção animal são a separação dos animais por sexos, utilização de métodos contraceptivos reversíveis, esterilização definitiva, eutanásia ou a transferência dos animais excedentes para locais fora do programa de criação (8).

No que diz respeito às intervenções realizadas no parque a aplicação de métodos contraceptivos correspondeu a 24% das medidas preventivas aplicadas. No caso da fêmea de tigre de Bengala (*Panthera tigris*) com quadro clínico de piómetra associada a ausência de interesse reprodutivo, fez com que se optasse por uma esterilização permanente. Nas espécies de babuínos-sagrados (*Papio hamadryas*) e madris (*Mandrillus sphinx*), esta última especialmente por ser considerada CITES I¹ e se encontrar inserida num programa de conservação da espécie, optou-se pela utilização de métodos contraceptivos reversíveis (12). A maioria dos métodos contraceptivos disponíveis interferem em alguma das etapas da síntese de hormonas e libertação para o controlo de um ou mais eventos reprodutivos (por exemplo ovulação, espermatogénese, transporte de esperma ou óvulo e implantação) (8). Nestes casos foi optado pelo uso de agonistas de GnRH, através da colocação de implantes de suprelorina na região medial do úmero esquerdo. Nas fêmeas, inicialmente há uma fase aguda que dura

¹ CITES, apêndice I – inclui todas as espécies ameaçadas de extinção que são ou podem ser afetadas pelo comércio de animais. Nestas espécies o comércio deve ser alvo de uma regulamentação particularmente restrita com o intuito de não colocar ainda mais em perigo a sua sobrevivência e apenas deve ser autorizado em situações excecionais (12).

alguns dias, em que a LH e FSH são estimuladas, entrando posteriormente numa fase crónica em que a secreção destas é bloqueada por um processo de retroregulação negativo dos recetores de GnRH das células que produzem LH e FSH (8). Logo nas fêmeas o efeito é semelhante ao de uma ovariectomia, mas reversível. Nos machos há um decréscimo inicial dos níveis de testosterona seguida de uma supressão crónica (8). A utilização destes inibidores em animais selvagens ainda carece de estudos conclusivos sobre o tempo que demora a atuar e a duração da acção, porém evidências em alguns machos de primatas (por exemplo, *Macaca silenus* e *Mandrillus sphinx*) sugerem que a supressão pode demorar mais tempo até começar a exercer a sua acção, quando comparado com a supressão em fêmeas e cães machos (8). A fertilidade é restaurada quando o implante é removido ou quando o conteúdo hormonal é esgotado, havendo então a necessidade de monitorização dos parâmetros e colocação de novo implante (8).

2.1.3. Treino médico

A reintrodução de animais e translocações são intervenções importantes no processo de salvamento de espécies da extinção, mas apresentam uma elevada taxa de insucesso, em que a mortalidade devido a ataques de predadores é a principal causa de fracasso (13). Os animais que por algum motivo tenham sido isolados/afastados dos seus predadores naturais, podem não voltar a expressar comportamentos anti-predatórios (13). Perante tal adversidade, os biólogos da conservação começaram a incluir treinos anti-predatórios no processo de preparação para a libertação dos animais, com o objetivo de intensificar a expressão deste tipo de comportamentos (13). As técnicas de treino envolvem então procedimentos clássicos de condicionamento, em que os animais aprendem a associar o aparecimento de determinados predadores a eventos aversivos (13). No entanto, os treinadores devem estar preparados para situações de emergência em que possam ocorrer respostas inapropriadas durante um treino (13).

O treino de animais realizado com a finalidade do animal colaborar voluntariamente em procedimentos veterinários torna-se um pilar muito importante nos cuidados de animais zoológicos e proporciona inúmeros benefícios (14). Deste modo, a realização de procedimentos de medicina preventiva, avaliação de parâmetros psicológicos básicos, exames à distância e físicos, procedimentos de diagnóstico, tratamentos e avaliações reprodutivas podem ser feitos de forma mais eficiente e menos stressante para o animal, removendo assim também o risco associado à realização de anestésias (4; 14). De facto, o treino médico também permite a realização de tratamentos a longo prazo, como injeções de insulina, que de outra forma seriam impraticáveis (4). A confiança desenvolvida entre o animal e o tratador pode tornar a introdução de novos animais um processo mais pacífico e com menos riscos,

possibilitando até a dessensibilização de um animal a uma prévia experiência negativa com o médico veterinário (4).

Por sua vez, o treino animal deve ser baseado no princípio do reforço positivo, ou seja, o animal é recompensado com algo que aprecia por ter realizado determinada resposta comportamental desejada (3). Segundo Laule, G. E., (2003) a reprimenda física não é considerada uma técnica de treino e o animal não deve ser sujeito a privação de comida, devendo-lhes ser fornecida a sua dieta habitual e, as recompensas do treino podem incluir porções dessa dieta ou outros brindes, porém têm de ser algo que o animal deseje para que valorize determinada ação (3; 5). Assim, o treino envolverá uma cooperação voluntária do animal, sendo considerado positivo para este quando proporciona oportunidades de aprendizagem que podem ser consideradas como enriquecimento ambiental, providenciando uma alteração dinâmica no dia do animal e melhoria na interação entre o humano e o animal (14).

As dificuldades no treino animal surgem quando os treinadores ou os responsáveis pelo manejo falham na compreensão do que motiva um animal específico ou comportamento natural de determinada espécie (5). Por sua vez, é necessário ter em conta que dois animais da mesma espécie podem não atribuir o mesmo valor a determinado reforço. Estas lacunas na compreensão de padrões comportamentais típicos, relacionados com a obtenção de comida ou na interpretação de estruturas sociais, podem limitar o treino ou originar alterações comportamentais (5). O termo *Drift* num treino surge quando um animal que está a ser treinado para um novo comportamento retorna a comportamentos instintivos (5). Muitas vezes essa atitude é confundida pelos treinadores como desobediência, estando associada a comportamentos inatos de alimentação, obtenção de comida ou atitudes gregárias (5). Assim, os bons treinadores de animais não só compreendem a ciência e a teoria do comportamento, mas também consideram o animal como um ser individual e o seu manejo único e específico (5).

Durante o período de estágio foi possível acompanhar o treino realizado numa fêmea de girafa (*Giraffa camelopardalis rothschild*) com hipercrescimento dos cascos. Este treino encontrava-se numa fase inicial, consistindo apenas na dessensibilização do animal ao manejo por parte dos tratadores e dos instrumentos a utilizar (Figura 4). Tendo como objetivo primário prosseguir para uma segunda fase, em que será realizado por rotina o procedimento de aparar os cascos da girafa. Como se trata de um trabalho gradual e evolutivo pretende-se também que a girafa venha a colaborar e permita a realização de outros procedimentos, como por exemplo, colheitas de sangue.



Figura 4 – Treino de dessensibilização da girafa Kimani (*Giraffa camelopardalis rothschild*).

2.2. Intervenções médicas

2.2.1. Colheita de sangue

Em aves

A veia de preferência para colheita de sangue nas aves é a veia jugular direita (a veia jugular esquerda é acessível mas de muito menor calibre), de seguida a veia braquial, a qual tem a desvantagem de ser muito superficial, com pouco tecido de suporte para dispersar um hematoma e, em algumas espécies é muito pequena, o que pode resultar no colapso da veia (15; 16; 17). Por outro lado, a veia braquial é ideal para injeções endovenosas por permitir o visionamento da agulha e conteúdo a entrar na veia, principalmente em aves grandes (15). Uma terceira veia de acesso é a metatarsiana medial, esta é principalmente utilizada em aves grandes e colocação de cateter (16; 17). As veias das aves têm paredes finas rompendo-se facilmente e a coagulação baseia-se na via de coagulação extrínseca, requerendo assim tromboplastina dos tecidos, em vez da via de coagulação intrínseca como nos mamíferos (17). Assim sendo, é necessário um cuidado acrescido para não romper a parede da veia e, após a punção da veia deve ser rapidamente aplicada pressão digital, para evitar o risco de ocorrer uma hemorragia rápida e fatal (17). A quantidade de sangue que poderá ser colhida com segurança de uma ave saudável é cerca de 10% do volume total de sangue circulante, ou aproximadamente 1%, ou menos, do peso corporal (18).

Colheita em grandes felídeos

Nos grandes felídeos, após uma correta imobilização química, a colheita de sangue, administrações endovenosas ou colocação de cateteres pode ser feita na veia jugular ou

safena medial, distalmente à articulação femurotibiopatelar (19). A veia coccígea também pode ser opção para colheita de sangue e administração de drogas anestésicas extra (19). A veia cefálica é excluída por ser difícil de visualizar em grandes felídeos (19).

Colheita em ungulados

Nos ungulados selvagens o acesso vascular mais comum é na veia jugular, podendo-se optar também pela veia cefálica, safena lateral, coccígea e veias auriculares com o animal em decúbito esternal ou lateral (19). Nos ungulados de maiores dimensões, a palpação da veia jugular poderá ser dificultada pela camada muscular que apresentam (19). Para contornar esse obstáculo se a pressão na veia for feita com o joelho, a mão fica livre para localizar a veia ao longo do pescoço (19). Na maioria dos ungulados intervencionados a colheita de sangue foi feita na veia jugular, como ilustra a Figura 5.



Figura 5 – Venopunção jugular num muflão (*Ammotragus lervia*).

Colheita em Primatas

Nos primatas o acesso venoso pode ser feito na veia cefálica, safena externa, veia jugular e femoral. As veias periféricas, assim como a cefálica e a safena externa tendem a colapsar facilmente, o que dificulta a colheita de quantidades de sangue significativas (19). Segundo a técnica descrita por Rolf-Arne Ølberg e Melissa Sinclair, 2014, e utilizada no parque em mandris (*Mandrillus sphinx*) e babuínos sagrado (*Papio hamadryas*) (Figura 6) envolve a colheita na região do triângulo femoral na região inguinal quando se pretende uma amostra superior a 1ml (19). A principal desvantagem deste método é o aumento do risco de formação de hematoma se se puncionar a artéria ou se não for feita uma correta hemóstase, por sua vez

os pequenos primatas podem ficar hipovolêmicos e morrer devido à perda de sangue num grande hematoma (19).



Figura 6 – Colheita de sangue na veia femoral num babuíno-sagrado (*Papio hamadryas*).

Como demonstra a Tabela 7, foram realizadas 91 colheitas de sangue entre mamíferos e aves, sendo que 15,38% foram realizadas para se proceder à sexagem das aves. A maioria das colheitas de sangue, 39,56%, foi feita por rotina associadas a outros procedimentos, nomeadamente, translocação de animais no parque, no caso dos sitatungas (*Tragelaphus spekii*), controlo reprodutivo, ou transporte para o exterior do parque nos restantes animais. Em 34 desses 36 procedimentos de colheita de sangue por rotina foram também realizados esfregaços sanguíneos para a realização do trabalho abordado neste relatório de estágio, tendo sido feitas mais 12 colheitas de sangue especificamente para a realização dos esfregaços.

Tabela 7 – Frequência absoluta (Fi) e relativa (Fr) da finalidade das colheitas de sangue realizadas. $n=91$, em que n corresponde ao número total de animais em que foram realizadas colheitas de sangue.

Colheitas de sangue	Fi	Fr
Sexagem	14	15,38%
Análises	29	31,87%
Rotina	36	39,56%
Esfregaços	12	13,19%
Total	91	100,00%

Foram também efetuadas 29 colheitas de sangue para análises sanguíneas específicas, quatro para controlo do efeito e aplicação de métodos contraceptivos em mandris (*Mandrillus sphinx*) e babuínos (*Papio hamadryas*). Num cavalo (*Equus caballus*) foi realizada uma análise devido a sinais de prostração e má condição corporal. Para proceder à vacinação de uma cadela contra a leishmaniose foi realizado um teste rápido de despiste da doença. Num carneiro macho (*Ovis aries*) a colheita de sangue foi realizada para análise de parâmetros renais. Um representante da ADSLA (Agrupamento de Defesa Sanitária do Litoral Alentejano) deslocou-se ao parque para realizar colheitas de sangue para o teste obrigatório de despiste de brucelose numa ovelha anã (*Ovis aries*), nas cabras anãs (*Capra aegragus hircus*) e cabras gírgentana (*Capra gírgentana*). Por fim, na espécie tigre de Bengala (*Panthera tigris*) as análises foram motivadas por sinais de anorexia apresentados pela tigresa e suspeita de afeção do trato reprodutivo.

A Tabela 8 associa as frequências das colheitas de sangue em cada espécie animal à finalidade que motivou a sua realização, fazendo uma síntese mais completa do procedimento. Permite concluir que das 91 colheitas de sangue realizadas 84,62% foram em mamíferos, com maior incidência nos muflões (*Ammotragus lervia*) com 17,6% das colheitas, tendo sido requeridas por análises rotinas. Por sua vez, nas aves as colheitas realizadas corresponderam a 15,38% das amostras, em que o objetivo dessas foi a sexagem de galinhas de Angola (*Numida meleagris*) e turacos (*Turaco sp.*).

Tabela 8 – Frequências absolutas (Fi), relativas (Fr), acumulada (Fr(a)) e finalidade das colheitas de sangue realizadas. n=91, em que *n* corresponde ao número total de colheitas de sangue realizadas.

Mamíferos																				Aves		Total
Primatas		Felídeos	Ungulados															Carnídeos				
	<i>Mandrillus sphinx</i>	<i>Papio hamadryas</i>	<i>Panthera tigris</i>	<i>Syncerus caffer nanus</i>	<i>Ovis aries</i>	<i>Capra aegragus hircus</i>	<i>Capra girgentana</i>	<i>Equus caballus</i>	<i>Equus asinus</i>	<i>Taurotragus oryx</i>	Búfalo afro-asiático	<i>Tragelaphus speki</i>	<i>Ammotragus levia</i>	<i>Kobus leche</i>	<i>Connochaetes taurinus</i>	<i>Axis axis</i>	<i>Cervus elaphus hispanicus</i>	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Numida meleagris</i>	<i>Tauraco sp.</i>		
	Análises							Esfregaços				Rotina					Sexagem					
Fi	2	3	2	1	2	13	4	1	5	2	5	2	16	6	2	8	2	1	8	6	91	
Fr(%)	2,2	3,3	2,2	1,1	2,2	14,3	4,4	1,1	5,5	2,2	5,5	2,2	17,6	6,6	2,2	8,8	2,2	1,1	8,8	6,6	100	
Fr(a)	84,62%																		15,38%		100%	

2.2.2. Identificação de animais

Apesar de se tratar de um parque zoológico onde parte dos animais se encontram em regime extensivo, no “Safari” é essencial ter o completo conhecimento da coleção zoológica, sendo que a forma mais rigorosa de identificação consiste na colocação de um identificador eletrónico, nomeadamente um *microchip*, que por norma é colocado dorsalmente, na região da espádua, à esquerda do animal. Estes animais selvagens não estão habituados a ser manipulados, como tal, a colocação do identificador eletrónico é feita apenas em duas situações, quando surge uma cria recém-nascida que ainda é facilmente capturada manualmente ou quando, por algum motivo, é efetuada a imobilização química do animal. Para proceder à identificação de crias é necessário manter sempre o contacto visual com a progenitora, pois esta poderá tentar proteger a cria perante a ameaça, portanto toda a intervenção deve ser o mais breve e cautelosa possível para minimizar o *stress* causado. Com o intuito de evitar a rejeição da cria pela progenitora deve-se camuflar odores ao esfregar as mãos em terra e reduzir o contacto com a cria ao mínimo essencial.

Contudo, também foi necessário identificar as cabras anãs, italianas e a ovelha anã, tendo-se optado pela colocação de brincos. Por sua vez, em seis porquinhos-da-Índia foram colocados identificadores eletrónicos.

Nas aves existem dois métodos de identificação: através da colocação de anilhas, abertas ou fechadas na extremidade dos membros posteriores, ou pela inserção de um identificador eletrónico no músculo peitoral (16). A colocação de um *microchip* é o método recomendado, visto que as anilhas apresentam alguns riscos para a ave, já que estas podem ficar presas na instalação ou ornamentos e, mesmo que a ave se consiga libertar, a inflamação e edema causado, pode resultar em colapso vascular e necrose distal à anilha (16). Assim, excluindo quando se tratam de aves com peso inferior a 150 gramas, em que é recomendado o uso de anilha, dever-se-á optar pelo uso de *microchip* (16). Durante o estágio foram utilizados os dois métodos de identificação, anilhas em oito *Numida meleagris* e *microchips* em seis *Tauraco sp*, aquando da colheita de sangue para sexagem.

2.2.3. Sexagem

Sexagem de Mamíferos

Para um melhor conhecimento da coleção animal existente é importante saber, além do número de exemplares de cada espécie, o sexo dos animais. Quando o dimorfismo sexual é evidente, ou ligeiramente dúbio, caso se trate, por exemplo, de um animal juvenil, a tarefa é simples, mas com alguns animais pode ser necessário anestésiar o animal para poder tirar conclusões.

Sexagem de Aves

Nas aves facilmente se encontram obstáculos à sexagem, a maioria dos psitacídeos são sexualmente monofórmicos, em que o macho e a fêmea são visualmente indistinguíveis, com exceção, por exemplo, do papagaio ecletus (*Eclectus roratus*) pois o macho apresenta uma coloração verde e a fêmea vermelha e roxa, evidenciando assim um dimorfismo sexual marcado (20). Todavia, nas espécies monomórficas, existem algumas características que podem ajudar os avicultores a opinar sobre o sexo da ave, porém são apenas indicadores incapazes de determinar de forma precisa (16; 20). Tais indicadores são então o tamanho da cabeça e bico, dimensão geral da ave, coloração das penas e comportamento agressivo ou palpação da ausência de fusão dos ossos pélvicos caudais à cavidade celômica, no caso das fêmeas, o que nem sempre é uma constante (16; 20). Como métodos de sexagem mais rigorosos e fiáveis pode-se optar por identificação do sexo da ave através do ADN, que se baseia na distinta composição dos cromossomas sexuais, sexagem cirúrgica ou um método não invasivo que consiste na sexagem através das penas (20). A sexagem cirúrgica por laparoscopia deve ser realizada sob anestesia geral e apenas em animais aparentemente saudáveis pelo risco que acarreta. O acesso é feito pelo lado esquerdo da ave, pela apresentação anatómica das fêmeas, em que apenas o ovário esquerdo é funcional e, como consequente será mais fácil de detetar que o ovário direito (15). No macho os testículos estão localizados numa posição ligeiramente ventral ao pólo cranial dos rins e da glândula adrenal, nas fêmeas a posição dos ovários é semelhante à do testículo esquerdo, mas, caso de trate de uma fêmea adulta o ovário ativo pode cobrir parcial ou totalmente a glândula adrenal esquerda (15). A sexagem através das penas foi realizada pela primeira vez em 1980 e consiste na remoção de penas e posterior análise cromossómica das células presentes em meios de cultura, realizados através de sangue da porção de crescimento da pena (20). Este método permite uma completa avaliação do cariótipo e identificação de defeitos nos cromossomas (inversões cromossómicas, translocações e triploidias) que reduzem a fertilidade (20). Como desvantagens apresenta o fato de demorar cerca de duas semanas para se obter um resultado e a possibilidade reduzida da cultura não se desenvolver (20).

Perante os métodos de sexagem disponíveis, segundo a Tabela 8, foi realizada a sexagem através de ADN por colheita de amostras de sangue nas aves em oito galinhas de Angola (*Numida meleagris*) e seis turacos (*Tauraco sp.*).

2.3. Patologia médica

A Tabela 9 permite verificar que as intervenções veterinárias foram registadas maioritariamente na área da dermatologia, com cerca de 30% dos casos, nove em mamíferos e três em aves. De seguida, surge a área de ortopedia com 17,50% dos casos intervencionados, quatro nos mamíferos e três nas aves. As áreas de imagiologia e ginecologia/obstetrícia corresponderam, respetivamente, a 15% dos casos intervencionados. Outra conclusão a ser

retirada da tabela é que 75% das intervenções veterinárias numa área específica decorreram em mamíferos e os restantes 25% nas aves.

Tabela 9 – Frequências absolutas (Fi) e relativas (Fr) das intervenções veterinárias nas diferentes áreas, de acordo com cada classe. n=40, em que n corresponde ao número total das intervenções veterinárias nas diferentes áreas.

Área	Mamíferos	Aves	Fi	Fr
Imagiologia	5	1	6	15,00%
Infeciologia	1	0	1	2,50%
Urologia	1	0	1	2,50%
Gastroenterologia	4	1	5	12,50%
Oftalmologia	0	1	1	2,50%
Dermatologia	9	3	12	30,00%
Neurologia	1	0	1	2,50%
Ortopedia	4	3	7	17,50%
Ginecologia/obstetrícia	5	1	6	15,00%
Fi	30	10	40	100,00%
Fr	75,00%	25,00%	100,00%	

O Gráfico 4 apresenta as frequências absolutas das intervenções veterinárias nas diferentes áreas de acordo com a classe em questão e permite verificar que foram registados mais casos na classe dos Mammalia comparativamente à classe das Aves, de tal forma que apenas na área de oftalmologia se observou o oposto.

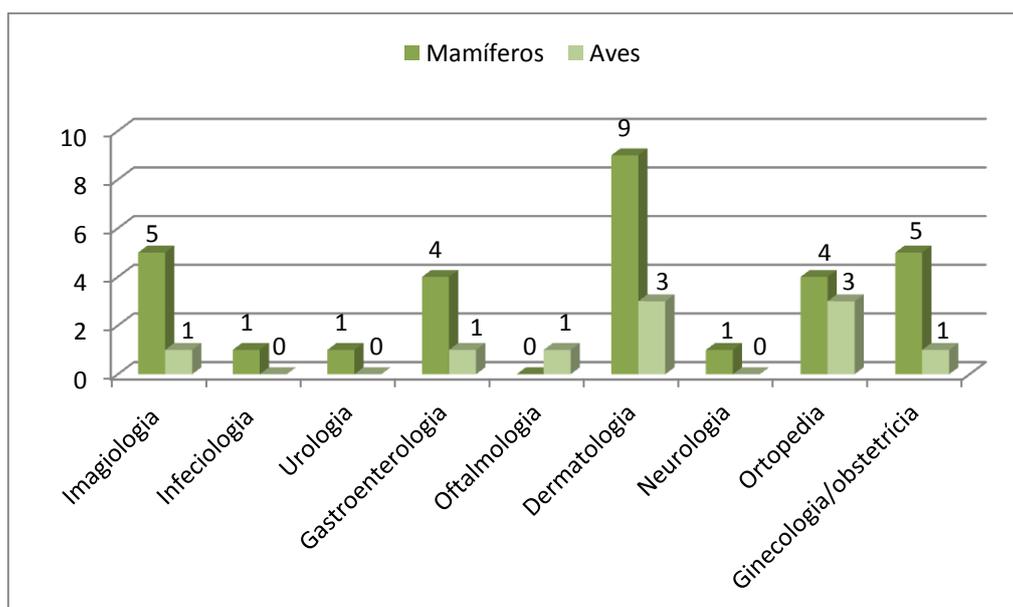


Gráfico 4 – Frequências absolutas das intervenções veterinárias nas diferentes áreas, de acordo com cada classe. $n=40$, em que n corresponde ao número total de intervenções veterinárias nas diferentes áreas.

2.3.1. Imagiologia

Como meio de diagnóstico complementar foram realizados exames radiológicos e ecográficos.

2.3.1.1. Radiologia

Na área da radiologia, como demonstra a Tabela 10, 75% dos exames realizados foram motivados por traumatismos ou fraturas ósseas. Um dos exames foi realizado numa ave da espécie *Tauraco sp.* e dois em mamíferos, um mandril (*Mandrillus sphinx*) e um órix de cimitarra (*Oryx dammah*). Os restantes 25% são atribuídos ao exame realizado a um Quati (*Nasua nasua*), com posterior diagnóstico de artrite.

Tabela 10 – Frequências absolutas (Fi) e relativas (Fr) dos casos desenvolvidos na área da radiologia. $n=4$, em que n corresponde ao número total de exames radiográficos.

Radiologia	Aves		Mamíferos				Fi	Fr
	<i>Tauraco sp.</i>	<i>Mandrillus sphinx</i>	<i>Oryx dammah</i>	<i>Nasua nasua</i>				
Traumatismo/fratura	1	1	1			3	75,00%	
Artrite				1		1	25,00%	
Fi	1		3			4	100,00%	
Fr	25,00%		75,00%			100,00%		

2.3.1.2. Ecografia

Como demonstra a Tabela 11, foram realizados exames ecográficos a dois mamíferos, um cavalo (*Equus caballus*) e uma fêmea de tigre de Bengala (*Panthera tigris*). No cavalo este meio de diagnóstico foi requerido por se tratar de um caso de cólica recorrente. Na fêmea de tigre a ecografia foi realizada para auxílio no diagnóstico de piómetra e visualização pré-cirúrgica.

Tabela 11 – Frequências absolutas (Fi) e relativas (Fr) dos casos desenvolvidos na área da ecografia. n=2, em que *n* corresponde ao número total de exames ecográficos realizados.

Ecografia	Mamíferos		Fi	Fr
	<i>Equus caballus</i>	<i>Panthera tigris</i>		
Cólica	1		1	50,00%
Piômetra		1	1	50,00%
Fi	1	1	2	100,00%
Fr	50,00%	50,00%	100,00%	

2.3.2. Infeciologia

A única doença infecciosa diagnosticada no parque durante o período de estágio desenvolveu-se num mamífero da espécie *Tragelaphus spekii*. O diagnóstico foi feito *post-mortem*, tendo sido realizada a colheita de amostras de órgãos, nomeadamente pulmão, tendo o resultado dado positivo para Pasteurelose, com o agente causal *Mannheimia haemolytica*.

Nos antílopes, família onde se inclui a espécie *Tragelaphus spekii*, a pasteurelose pode ser causada por dois agentes, *Pasteurella multocida* e *Mannheimia haemolytica*, e a transmissão ocorre através de aerossóis ou contacto direto (4; 21). A *Pasteurella* é um agente comensal do trato respiratório superior (4). Sob condições normais, após a sua inalação, os macrófagos alveolares têm a capacidade de remover eficientemente o agente através de mecanismos de fagocitose (4; 21). Portanto em animais saudáveis, não sujeitos a situações de *stress* não há desenvolvimento da doença. Assim, a Pasteurelose encontra-se normalmente associada à combinação de uma infeção viral com uma situação debilitante, como, por exemplo, transporte, período de escassez de alimento, desmame, grandes variações na amplitude térmica (4; 21). Ou seja, fatores de *stress* para o animal possibilitam o aumento do número total e virulência de *Pasteurella* desde a nasofaringe até aos alvéolos, sendo que neste último os macrófagos já não conseguem realizar uma correta depuração (4; 21).

A *Pasteurella multocida* exibe um quadro de broncopneumonia supurativa com ou sem rinite, corrimento nasal, anorexia, piroxia, taquipneia/dispneia (4). Assim como o agente bacteriano *Mannheimia haemolytica* dá origem a septicémia, morte súbita, depressão aguda e piroxia (4). O diagnóstico é feito com base na história e sinais clínicos, achados na necrópsia ou através de cultura pulmonar ou sangue (4). O tratamento inclui antibioterapia, manutenção da temperatura corporal do animal e correta ventilação do local (4). Deve também ser realizado o tratamento de infeções concomitantes e redução de fatores de *stress* como excesso

populacional (4). Por sua vez, deve-se ponderar a administração de antibioterapia profiláctica previamente ao transporte (4).

2.3.3. Urologia

Num mamífero macho, da espécie ovelha anã (*Ovis aries*), foi observado um quadro clínico de prostração e anorexia associado a estrangúria. Foi possível constatar que este apresentava acumulação de material orgânico na uretra de etiologia não diagnosticada, tendo resultado em oligúria e anúria. Como a anatomia dos ovinos não permitiu a algaliação do animal optou-se pela eutanásia.

2.3.4. Gastroenterologia

Analisando os dados da Tabela 12, dos seis casos inseridos na área de gastroenterologia, 50% corresponderam a casos de distúrbios nutricionais em dois mamíferos, um babuíno sagrado (*Papio hamadryas*) e uma fêmea de tigre de Bengala (*Panthera tigris*), e numa ave, galinha de Angola (*Numida meleagris*). Ocorreu também um caso de acidose, num búfalo do Congo (*Syncerus caffer nanus*), dois de cólica em equídeos, um pônei de Shetland (*Equus ferus caballus*) e um cavalo (*Equus caballus*).

Tabela 12 – Frequências absolutas (Fi) e relativas (Fr) dos casos desenvolvidos na área da gastroenterologia. n=6, em que n corresponde ao número de casos de gastroenterologia.

Gastroenterologia	Mamíferos					Aves	Fi	Fr
	<i>Papio hamadryas</i>	<i>Panthera tigris</i>	<i>Equus ferus caballus</i>	<i>Equus caballus</i>	<i>Syncerus caffer nanus</i>	<i>Numida meleagris</i>		
Cólica			1	1			2	33,33%
Distúrbios nutricionais	1	1				1	3	50,00%
Acidose					1		1	16,67%
Fi			5			1	6	100,00%
Fr			83,33%			16,67%	100,00%	

2.3.5. Oftalmologia

O único caso de oftalmologia assistido foi observado numa ave da falcoaria, uma coruja do mato (*Strix aluco*), a qual apresentava úlcera da córnea.

2.3.6. Dermatologia

Tabela 13 – Frequências absolutas (Fi) e relativas (Fr) dos casos desenvolvidos na área da dermatologia. n=12, em que n corresponde ao número total de casos na área da dermatologia.

Dermatologia	Mamíferos					Aves			Fi	Fr
	<i>Equus ferus caballus</i>	<i>Equus asinus</i>	<i>Phacochoerus africanus</i>	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Tragelaphus spekii</i>	<i>Buteo buteo</i>	<i>Falco tinnunculus</i>	<i>Phoeniconaias minos</i>		
Ferida cutânea			1	4	1				6	50,00%
Pododermatite						1	1		2	16,67%
Alergias		2							2	16,67%
Abcessos	1							1	2	16,67%
Total	1	2	1	4	1	1	1	1	12	100,00%
Fi			9			3				
Fr			75,00%			25,00%			100,00%	

Como demonstra a Tabela 13, 75% dos 12 casos de dermatologia ocorreram em mamíferos. Maioritariamente em cães (*Canis lupus familiaris*) com quatro casos associados a feridas provocadas por praganas e desenvolvimento de miíases, seguida da espécie *Equus asinus* com dois casos de crises alérgicas. Nas aves, foi acompanhado um caso de abcessos nos membros posteriores de um flamingo pequeno (*Phoeniconaias minos*) e os restantes 16,67% foram situações de pododermatite em aves de rapina.

A pododermatite é uma afeição comum nas aves de rapina em cativeiro, como resultado do manejo realizado, não se tratando então de uma doença infecciosa (15). Assim, durante o estágio foram acompanhados dois casos de pododermatite em aves, nomeadamente num peneireiro (*Falco tinnunculus*) e numa águia de asa redonda (*Buteo buteo*). Esta condição é rara em aves selvagens e está tipicamente associada a uma ferida pré-existente num ou em ambos os membros (15). Surge por uma pressão anómala exercida na base da extremidade do membro, normalmente associada a poleiros com estrutura ou substratos inadequados (15). A própria instalação pode potenciar o aparecimento de pododermatites através da indução de traumas na almofadinha plantar, por exemplo, ao passar de poleiro para poleiro (15). No entanto, raramente, estas lesões também podem ser auto-infligidas ou provocadas pela presa no momento da captura. Secundariamente podem ocorrer infeções por *Escherichia coli* ou *Staphylococcus sp* (15). O tratamento depende da gravidade da lesão, tendo como princípio a

remoção da causa e tratamento da ferida (15). Em casos muito graves poderá ser necessário ponderar a eutanásia. Como as causas da pododermatite estão relacionadas com o manejo, o tratamento é complexo e prolongado, devendo-se então apostar na prevenção (15). As medidas preventivas passam por uma dieta nutritiva, equilibrada e apropriada, evitando o excesso de peso e colocação de poleiros revestidos e adaptados para cada espécie e sexo (15). De seguida, é importante que a ave realize exercício adequado e tenha espaço suficiente para efetuar uma aterragem normal (15). Para controlo deve-se observar regularmente a condição dos membros posteriores numa superfície regular (15).

2.3.7. Neurologia

Nesta área apenas se registou um caso num sitatunga (*Tragelaphus spekii*) em estado convulsivo.

2.3.8. Ortopedia

Através da análise da Tabela 14, é possível verificar que na área de ortopedia, 57,14% dos casos foram observados em mamíferos e 43,86% em aves, correspondendo a um total de sete animais assistidos. Por um lado, 85,71% das intervenções estiveram associadas a processos agudos, sendo que 42,86% dos animais apresentavam claudicação: duas aves, um urubu de cabeça vermelha (*Cathartes aura*) e um marabu (*Leptoptilos crumeniferus*) e um mamífero, um muflão (*Ammotragus lervia*). Um órix de cimitarra (*Oryx dammah*) sofreu um traumatismo, no qual foi diagnosticado rutura da cápsula articular e ligamentos da articulação carpo-metacárpica.

Tabela 14 – Frequências absolutas (Fi) e relativas (Fr) dos casos desenvolvidos na área de ortopedia. n=7, em que n corresponde ao número total de casos de ortopedia.

Ortopedia		Aves					Mamíferos			Fi	Fr
		<i>Tauraco sp.</i>	<i>Cathartes aura</i>	<i>Leptoptilos crumeniferus</i>	<i>Mandrillus sphinx</i>	<i>Oryx dammah</i>	<i>Ammotragus lervia</i>	<i>Nasua nasua</i>			
Agudo	Fratura	1			1				2	28,57%	
	Rutura de cápsula articular e ligamentos					1			1	14,29%	
	Claudicação		1	1				1	3	42,86%	
Crónico	Artrite							1	1	14,29%	
Fi			3			4			7	100%	
Fr			42,86%			57,14%			100,00%		

De facto, as fraturas, 28,57% dos casos de ortopedia, observadas num turaco (*Tauraco sp.*) e num mandril (*Mandrillus sphinx*) e a claudicação do muflão (*Ammotragus lervia*) estiveram associadas a processos de captura. Na verdade, durante processos de imobilização e captura há vários fatores que podem resultar em lesões físicas, como contusões, lacerações, abrasões e fraturas nos animais (19). Estes fatores podem ser inerentes ao ambiente e ao comportamento do animal, como falhas no equipamento, técnica ou na injeção do fármaco (19). Os casos mais simples são de fácil resolução, mas quando existem complicações, como fraturas ou outros prognósticos reservados difíceis de tratar poderá ser necessário proceder, por motivos éticos, à eutanásia do animal (19). O trauma físico poderá ser prevenido pelo levantamento de potenciais riscos na instalação previamente à captura e correto manuseamento do equipamento e manejo do animal (19).

Por sua vez, como processo crónico, que correspondeu a 14,29% das observações, foi possível acompanhar um coati (*Nasua nasua*), com sinais de anorexia, claudicação, prostração, associado a um processo de artrite.

2.3.9. Ginecologia/ obstetrícia

A Tabela 15 permite verificar que na área da ginecologia/obstetrícia só foram intervencionados mamíferos. De facto, 83,33% da casuística ocorreu em cabras anãs (*Capra aegragus hircus*), associados a distócias, prolapsos uterinos e mastites, por sua vez, 16,67% dos casos correspondem a um diagnóstico de piómetra observado numa fêmea de tigre de Bengala (*Panthera tigris*).

Tabela 15 – Frequências absolutas (Fi) e relativas (Fr) dos casos desenvolvidos na área da ginecologia e obstetrícia. n=6, em que n corresponde ao número total de casos de ginecologia e obstetrícia.

Ginecologia / Obstetrícia	Mamíferos		Fi	Fr
	<i>Capra aegragus hircus</i>	<i>Panthera tigris</i>		
Piómetra		1	1	16,67%
Distócia	2		2	33,33%
Prolapso uterino	1		1	16,67%
Mastite	2		2	33,33%
Fi	5	1	6	100,00%
Fr	83,33%	16,67%	100,00%	

Piômetra

Piômetra consiste na acumulação de material purulento no útero, secundária a uma afeção bacteriana, é mediada hormonalmente e ocorre durante o diestro (22). É menos frequente em felinos que em caninos, possivelmente pelo facto de nas gatas a ovulação ocorrer de forma induzida (22; 23). Dentro dos felinos as piômetras tendem a ser mais frequente nos grandes felinos exóticos, como leopardos, leões, tigres e ligres, com maior incidência em leões e animais com mais de dez anos (22; 23). Tal como nos carnívoros domésticos, também aparenta estar associada a hiperplasia endometrial quística, por exposição crónica à progesterona (22; 23). Secundariamente ocorre sobrecrecimento bacteriano da flora vaginal que acede no útero durante o proestro e estro (22; 23). Apesar de a ovulação ocorrer de forma induzida não é necessário que haja penetração, portanto deve-se ter em consideração que a ovulação pode surgir de forma variável em leões ou tigres alojados individualmente ou com outras fêmeas (22; 23). Os sinais clínicos variam dependendo se o cérvix está fechado ou aberto, podendo estes incluir descarga vulvar, letargia, febre, anorexia, vômito, poliúria e polidipsia (22; 23). O principal diagnóstico diferencial da piômetra nos grandes felinos é cistite, sendo que a confirmação é feita preferencialmente por exame ecográfico (23).

A ovariectomia é considerada o tratamento de eleição para piômetra nos carnívoros domésticos, sendo também recomendada para os grandes felídeos (23). Apesar de se tratar de uma intervenção cirúrgica relativamente simples nos felídeos domésticos, nos grandes felídeos como os tigres, o pós-operatório é crucial no sucesso da intervenção, dado o risco de deiscência de sutura ou infeção secundária, caso o felídeo interfira com o processo de cicatrização.

Assim sendo, foi confirmado o diagnóstico de piômetra fechada, numa fêmea de tigre de Bengala (*Panthera tigris*) com 14 anos, por exame ecográfico e posterior remoção cirúrgica (Figura 7,8).



Figura 7 – Intervenção cirúrgica de ovariectomia numa fêmea de tigre de Bengala (*Panthera tigris*).



Figura 8 – Hiperplasia endometrial quística numa fêmea de tigre de Bengala (*Panthera tigris*) após ovariectomia.

Distócia

O conceito de distócia refere-se a um parto anormal, difícil ou lento, sendo portanto uma urgência médico-veterinária (24). É uma condição comum em pequenos ruminantes (caprinos e ovinos) que resulta em elevadas perdas económicas associada a mortalidade neonatal, materna ou problemas de fertilidade (25). Partos distócicos podem estar na origem de uma maior prevalência de retenção de membranas fetais e infeções uterinas, com consequente aumento do intervalo entre partos (24). A distócia pode ser motivada por causas maternas tais como dilatação incompleta da cérvix, torção uterina, estreitamento da pélvis e inércia uterina secundária. Também pode ocorrer devido a causas fetais como alterações da apresentação, postura e posição, tamanho ou existência de “monstros”, ou ainda por situações relacionadas com o maneio (24; 25).

O canal pélvico nos caprinos e ovinos é bastante frágil, como tal a força necessária para expulsar um feto com uma incorreta apresentação pode resultar em rutura uterina com subsequente prolapso de órgãos abominais, portanto a assistência ao parto deve ser ponderada e cautelosa (25). A realização de uma cesariana é considerada um método efetivo para o tratamento da maioria dos tipos de distócia, sendo segura para a cria e progenitora, especialmente quando realizada o mais próximo possível do início do trabalho de parto (25).

Durante o estágio ocorreram dois casos de distócia em cabras anãs (*Capra aegragus hircus*), nas quais foram necessárias intervenções veterinárias. Numa primeira situação, motivada por causas fetais, foi necessário auxiliar o caprino a expulsar o feto morto, tendo-se constatado que o feto apresentava dimensões demasiado grandes para o decorrer de um parto eutócico (Figura 9). Posteriormente procedeu-se à lavagem intra-uterina com solução fisiológica e solução iodada, administração de antibioterapia (Penicilina SC e Tetraciclina efervescente IU), anti-inflamatório (Flunixin Meglumina IM), cálcio SC/IM e suplementação com solução de glucose SC. O segundo caso de distócia ocorreu numa cabra primípara, em que a dilatação incompleta do cérvix impossibilitou a expulsão do feto. Sendo assim, na

tentativa de recuperar a progenitora foi realizada fetotomia e suplementação com cálcio SC e multivitaminas, porém a fêmea debilitada acabou por não sobreviver a todo o processo.



Figura 9– Progenitora fazendo o reconhecimento do nado morto após parto distócico.

Prolapso uterino

O prolapso uterino é uma complicação que pode ocorrer no pós parto que exige rápida intervenção (24). Normalmente o prolapso ocorre 12 a 24 horas após o parto e pode ser agravado pela ocorrência de inversão parcial do cérvix, o que dificulta o recolocamento do útero (26).

Esporadicamente também podem ocorrer prolapsos do corno uterino não grávido durante a gestação, o que normalmente está associado a uma diminuição do tônus do miométrio, o que predispõe ao desenvolvimento de um quadro de hipocalcemia e distócia, causando fadiga muscular e trauma (26). De facto, ao longo das décadas também têm sido reportados casos de tratamento com sucesso de prolapsos do corno uterino não grávido durante a gestação, com manutenção de uma gestação viável (27). A extração manual da cria e a retenção das membranas fetais pode iniciar a eversão uterina dos cornos uterinos seguida por um completo prolapso uterino depois do parto (26). O prolapso uterino é uma emergência veterinária, já que uma atuação breve facilita o recolocamento do útero antes da acumulação excessiva de edema, contaminação, trauma da mucosa e encerramento do cérvix (26).

Durante o período de estágio foi então acompanhado um caso de prolapso uterino anterior ao parto, numa cabra anã (*Capra aegragus hircus*). Como tal, foi necessário intervir mantendo a possibilidade do parto ocorrer de forma natural. Assim, com a cabra em estação, a mucosa prolapsada foi lavada abundantemente, com solução fisiológica e solução iodada e o órgão foi recolocado na sua posição anatómica. Neste caso, para além da administração de antibioterapia e anti-inflamatórios, podem também ser colocadas suturas de suporte, o que implica que o animal fique sob observação pela possibilidade de ocorrência de recidivas, e como conseqüente, aumento do risco de necrose por compressão vaginal (24). Como no caso em questão o prolapso foi pré-parto, a atenção prestada ao animal foi redobrada, pois aos

primeiros sinais de entrada em trabalho de parto as suturas foram removidas, tendo o parto ocorrido naturalmente, não havendo recidiva do prolapso no pós-parto.

Mastites

Durante o período em estudo, ocorreram dois casos de mastite clínica em cabras anãs (*Capra aegragus hircus*), em que numa das cabras foi necessário proceder a intervenção cirúrgica para a realização de mastectomia.

2.4. Imobilização química

A imobilização química pela projeção remota de drogas (dardos) é muitas vezes a melhor opção e, por vezes, o único método disponível aos veterinários e investigadores para examinar, tratar, translocar e marcar determinadas espécies de mamíferos (28). A determinação exata do peso só é possível após o animal estar sedado, assim o veterinário deve ter noção prévia do peso médio e sexo da espécie em questão, grau de excitação esperado e perigos existentes, de tal modo que, no processo de seleção das drogas, se opte por drogas com uma boa margem de segurança e que possuam agente revertor (2). Geralmente é mais seguro apostar em sobredosagem que subdosagem, pois o prolongamento do período de anestesia pode reduzir o *stress* e o risco associado a complicações (19). De facto, raramente a imobilização é feita apenas com uma droga, já que a combinação de drogas permite reduzir a quantidade a administrar de cada agente e consequentemente diminuir os efeitos secundários que cada uma apresenta, devendo-se também preferir drogas de rápida indução (2). Como tal, as capturas devem ser realizadas com uma equipa de profissionais com treino específico, experiência e conhecimento em captura de animais selvagens, anestesia, maneio e técnicas de suporte básico de vida tanto humano como animal.

A captura e anestesia de animais selvagens são procedimentos que apresentam sempre algum risco de mortalidade associado, mesmo em animais saudáveis (29). Primeiramente as mortes podem estar direta ou indirectamente relacionadas com o processo de captura, como por exemplo, afogamentos durante a indução, trauma inflingido pelo dardo (ex. pneumotórax), sobredosagem, na medida em que as drogas imobilizantes interferem com a função respiratória e termorregulação, podendo levar a depressão respiratória, acidose, hipoxia e hipertermia (19; 29). Por sua vez, também podem ter como causa efeitos secundários à captura, como *stress*, miopatia, trauma provocado por armadilhas, separação da cria e progenitora e problemas com aplicação de transmissores por implantes ou colares (29). As principais causas de mortalidade durante a anestesia em animais domésticos são anestésias em animais não saudáveis, com baixa condição corporal ou falha na obtenção do correto peso corporal, utilização de medição pré-anestésica inapropriada, falta de equipamentos em situações de emergência e inexperiência do operador (30). Como a captura de animais selvagens não permite um controlo rigoroso desses fatores, o risco é maior, sendo este

acrescido quando a captura é realizada com um propósito específico, como avaliação do estado de animais sobre *stress* ambiental ou doença (29).

A miopatia de captura, doença do músculo branco ou rabdomiólise induzida pelo exercício, é uma doença metabólica, não infecciosa de elevada morbidade e mortalidade. Normalmente esta condição está associada a ações de perseguição, captura, contenção e transporte de animais, sendo caracterizada por acidose metabólica, necrose muscular e mioglobínúria (19; 31). De uma forma geral a sua fisiopatogenia envolve a exaustão da adenosina trifosfato muscular esquelética e cardíaca (ATP), diminuição do aporte de oxigénio aos tecidos e aumento da produção de ácido láctico, resultando em necrose muscular, libertação de mioglobina e falha renal, que leva a morte do animal (4). Apresenta como sinais clínicos rigidez muscular, dor muscular severa, ataxia, paresia, torcicolo, prostração e paralisia (19). Como causas predisponentes estão incluídos fatores ambientais (temperaturas elevadas e humidade), certas raças (niala, damalisco, palanca vermelha, búbalo, elande, veado, cudu, e impala), deficiências em vitamina E ou selénio e a realização de capturas em animais gestantes ou de idade avançada (4). Quando os sinais de miopatia de captura são evidentes, as possibilidades de instituir um tratamento com sucesso são muito reduzidas (4). A prevenção consiste num planeamento cuidadoso da captura, com tempos de perseguição inferiores a três minutos, temperatura ambiente inferior a 20°C, tempo de contenção mínimo e recurso a sedação e anestesia geral quando necessário (4). Se, apesar de todos os cuidados, o animal ficar extremamente stressado, hipertérmico ou entrar em hipoxia durante a captura, deve ser instituído um tratamento agressivo com fluidoterapia e bicarbonato de sódio (bólus de 1-2 mEq/kg) para tratamento da acidose metabólica e, se possível realizar ionografia para monitorizar o equilíbrio ácido base e electrólitos durante o tratamento (4). Num animal saudável os valores de lactato são inferiores a 2 mmol/L, valores superiores a 5 ou 6 mmol/L estão associados a um mau prognóstico (4). Para controlo da inflamação sem o comprometimento renal deve-se optar pela administração de corticoesteróides e DMSO (10% com a fluidoterapia IV), ou uma combinação das duas, em detrimento do uso de anti-inflamatórios não esteróides (4). Após a fase inicial do tratamento, o animal deve ser mantido num local calmo, fresco e recomenda-se a monitorização do débito urinário (1 mL/kg/hr) durante vários dias (4).

Assim sendo, os riscos associados podem ser reduzidos através de simples procedimentos de manejo, como ter em atenção a velocidade de perseguição, o tempo de transporte e capturar um grupo ou família, em vez de capturar apenas um indivíduo (2; 19). Em relação à manipulação, a aproximação deve ser cautelosa e seguida da colocação de um pano ou venda nos olhos no animal, diminuindo assim a sua perceção sensorial, o ruído deverá ser minimizado através da colocação de compressas nos ouvidos. O posicionamento correto do animal é em decúbito esternal com o focinho pendente e a língua para fora, para evitar que ocorra vômito e regurgitação ou asfixia e timpanismo (29). Também é benéfica a utilização de oxigenioterapia ou o uso de tranquilizantes (32). Quanto à recuperação, o animal deve ser colocado num local seguro e calmo, de preferência sem sol ou vento, afastado de perigos,

obstáculos ou água, numa posição confortável com as vias respiratórias desobstruídas. De seguida, uma pessoa deve permanecer com o animal para administrar o antídoto e depois deve manter alguma distância de segurança para observar a recuperação (2; 19). Para evitar o aparecimento de situações de miopatia de captura, nos animais capturados deve ser feita a administração de vitamina E e selénio na dose de 1mL/10Kg.

Por sua vez, os processos de imobilização química constituíram parte considerável dos procedimentos realizados durante o período de estágio. Sendo que, como demonstra o Gráfico 5, 41 das anestésias realizadas tiveram como intuito a captura do animal (71,9%), motivadas maioritariamente por transporte para o exterior do parque, excetuando os dois sitatungas (*Tragelaphus spekkii*), em que a captura teve como objetivo a mudança de instalação no parque, e duas crias de gnu azul (*Connochaetes taurinus*), nas quais foi feita a sexagem e colocação de identificação eletrónica.

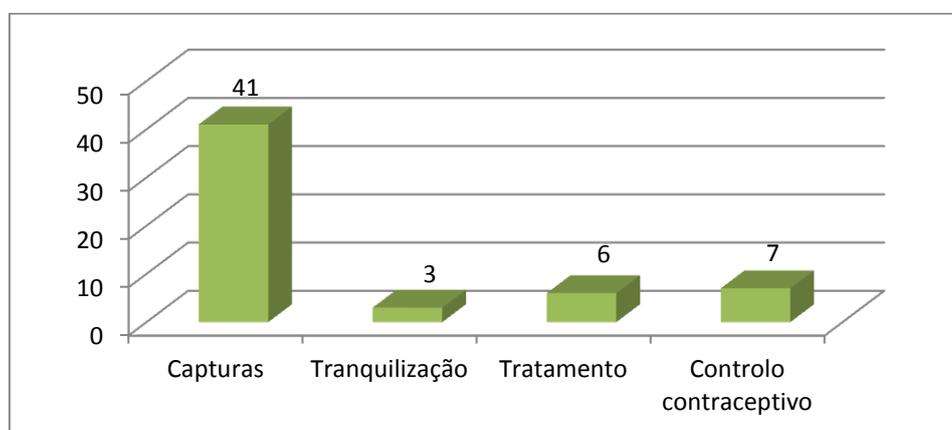


Gráfico 5 – Frequências absolutas das imobilizações químicas realizadas em mamíferos para captura, tranquilização, tratamento ou controlo contraceptivo. $n=57$, em que n corresponde ao número total de imobilizações químicas realizadas.

Na maioria das capturas realizadas, 65%, foi utilizado o protocolo “MBKeta”, desenvolvido pelo médico veterinário João Simões de Almeida, no seguimento da experiência adquirida a imobilizar ungulados selvagens, que consiste na associação de três anestésicos: quetamina na dose de 1,5 mg/kg, medetomidina e butorfanol ambos na dose de 0,05 mg/kg cada, administrados por via intramuscular, através de um dardo projetado por uma espingarda de ar comprimido (32). Para uma melhor precisão na administração o animal deve estar a uma distância entre 10 a 40 metros (19). Nestes casos a reversão anestésica da medetomidina foi feita com antipamezol, na proporção de quatro a cinco vezes a dose de medetomidina (32). Este protocolo apresenta um conjunto de características que permitem a sua utilização em ungulados selvagens de pequeno e médio porte, durante um período de 45 minutos a uma hora, com um relaxamento muscular adequado e um plano anestésico estável e suficiente para a realização de pequenos procedimentos cirúrgicos (32). Apresentou bons tempos de indução, entre três a cinco minutos e foi possível reverter por completo a anestesia após 30 minutos de

sedação após a administração do antídoto. Este protocolo, tal como muitos outros, apresenta as suas limitações, não podendo ser aplicado a todas as espécies, como por exemplo gamos (*Dama dama*) por serem animais muito resistentes à maioria dos protocolos anestésicos, sendo a sua imobilização química considerada bastante complicada (32). Neste período, como demonstra a Tabela 16, foi usado em veados ibéricos (*Cervus elaphus hispanicus*), chitais (*Axis axis*), cobos de leche (*Kobus leche*) e muflões (*Ammotragus lervia*). A monitorização da sedação dos veados ibéricos exigiu maior atenção pela sensibilidade desta espécie para o estado de hipoxémia (33).

De facto, a combinação de medetomidina, quetamina e butorfanol (MQB) tem sido usada e avaliada com sucesso numa vasta gama de espécies não domésticas, pois aparenta usufruir do efeito sinérgico da combinação das drogas originando uma anestesia facilmente reversível pelas baixas doses de quetamina utilizadas e a capacidade de antagonizar a medetomidina e butorfanol com antipamezol e naloxona, respetivamente (34). Em 2010 foi publicado um estudo por Georoff, T.A. et al. que consistiu na avaliação da combinação medetomidina ($90.0 \pm 8.8 \mu\text{g/kg}$), quetamina ($2.7 \pm 0.3 \text{ mg/kg}$), e butorfanol ($0.3 \pm 0.03 \text{ mg/kg}$) e antagonização com naltrexona ($2.7 \pm 0.25 \text{ mg/kg}$) e antipamezol ($0.45 \pm 0.04 \text{ mg/kg}$) em sete machos adultos de Guanacos (*Lama guanicoe*) (34), utilizando assim doses ligeiramente superiores de quetamina e menores de medetomidina que o protocolo "MBKeta". Os resultados deste estudo demonstraram bons tempos de indução, rápida e suave, com excelente relaxamento muscular, a ventilação manteve-se espontânea durante a anestesia em todos os animais, tendo apenas sido registada alguma bradicardia (34). Nas anestésias realizadas durante o estágio e neste estudo verificou-se que uma suplementação com oxigénio durante 20 a 30 minutos resulta em aumentos significativos dos valores de PaO₂ (34). As recuperações anestésicas foram graduais e sem complicações (34).

Tabela 16 – Frequências absolutas (Fi) e relativas (Fr) dos casos em que foi necessário realizar imobilização química. n=57, em que *n* corresponde ao número total de imobilizações químicas realizadas.

Imobilizações químicas	Mamíferos											Fi	Fr(%)
	<i>Mandrillus sphinx</i>	<i>Papio hamadryas</i>	<i>Panthera tigris</i>	<i>Ammotragus lervia</i>	<i>Camelus dromedarius</i>	<i>Tragelaphus spekii</i>	<i>Kobus leche</i>	<i>Connochaetes taurinus</i>	<i>Oryx dammah</i>	<i>Axis axis</i>	<i>Cervus elaphus hispanicus</i>		
Capturas				21	2	6	2			8	2	41	71,9
Tranquilização					2				1			3	5,3
Tratamento		1	3			1			1			6	10,5
Controlo contraceptivo	3	4										7	12,3
Fi	3	5	3	21	2	3	6	2	2	8	2	57	100
Fr (%)	5,2	8,8	5,3	36,9	3,5	5,3	10,5	3,5	3,5	14	3,5	100	

Quanto às tranquilizações, na Tabela 16 não estão incluídas tranquilizações efetuadas após capturas, mas sim a administração de tranquilizantes de longa ação, o que correspondeu a 5,3% das intervenções, tendo sido administradas duas em dromedários (*Camelus dromedarius*), antes da realização de um transporte, e uma num macho dominante de órix de cimitarra (*Oryx dammah*). Os tranquilizantes de longa duração podem exercer a sua ação entre 12h e 30 dias, em certas circunstâncias o seu uso pode ser benéfico, como por exemplo transportes, noutras pode acrescer problemas, por exemplo num grupo social de animais pode influenciar hierarquias (35). As anestésias associadas ao controlo contraceptivo foram realizadas como método de contenção em primatas, três na espécie mandril (*Mandrillus sphinx*) e quatro em babuínos sagrado (*Papio hamadryas*). Os restantes 10% das imobilizações químicas foram efetuados para a realização de tratamentos.

2.5. Intervenções cirúrgicas

Durante o período de estágio foram realizadas três intervenções cirúrgicas em mamíferos, como demonstra a Tabela 17, duas em tecidos moles, uma ovariectomia numa fêmea de tigre de Bengala (*Panthera tigris*), uma mastectomia numa cabra anã (*Capra aegragus hircus*) e uma cirurgia ortopédica, num primata da espécie mandril (*Mandrillus sphinx*) com fratura de fémur.

Tabela 17 – Frequências absolutas (Fi) e relativas (Fr) das intervenções cirúrgicas realizadas. n=3, em que n corresponde ao número total de intervenções cirúrgicas realizadas.

Intervenções cirúrgicas	Mamíferos			Fi	Fr
	<i>Mandrillus sphinx</i>	<i>Capra aegragus hircus</i>	<i>Panthera tigris</i>		
Mastectomia		1		1	33,33%
Ovariectomia			1	1	33,33%
Ortopedia	1			1	33,33%
Fi	1	1	1	3	100,00%
Fr	33,33%	33,33%	33,33%	100,00%	

Segundo um estudo realizado por Jarrell, H. M., em 2011, as fraturas nos primatas exibem um padrão de acordo com o seu modo de locomoção, tendência arborícola e peso corporal, estando todas as variáveis correlacionadas (36). Como tal, as preferências locomotoras estão relacionadas com a frequência de fraturas, na medida em que os primatas com tendência para andar suspensos têm maior propensão para fraturas, enquanto que os primatas saltadores têm menor incidência de fraturas (36). Por outro lado, a localização das fraturas também está associada a estas variáveis, ou seja, quando um primata que tem por preferência andar suspenso fratura um osso, há uma maior tendência para que a fratura seja de úmero ou fémur (36). Por sua vez, os pequenos primatas, de tamanho médio ou arborícolas apresentam maior incidência de fraturas de tibia ou fíbula em comparação a outros ossos longos (36). Os grandes quadrúpedes tendem a fraturar qualquer osso longo, exceto a tibia ou fíbula. Em relação aos primatas saltadores, as fraturas surgem maioritariamente na clavícula. Assim sendo o *Mandrillus sphinx*, grande quadrúpede com preferências terrestres e parcialmente arborícolas (no caso das fêmeas), apresenta uma maior propensão para fraturar ossos longos, excepto a tibia e fíbula (36).

Para a realização da cirurgia da fêmea de mandril (*Mandrillus sphinx*) foi necessário proceder à imobilização química e transporte para um hospital veterinário em Lisboa, com

instalações, equipamentos e cirurgião especializado em cirurgia ortopédica. Nos processos de imobilização química de primatas, especialmente neste caso em que a mandril apresentava uma fratura de fêmur, existem dois momentos críticos, a administração dos agentes anestésicos e a captura do animal (19). Na verdade, é possível provocar uma lesão traumática com a projeção de um dardo e, como os primatas têm tendência a procurar proteção nos locais mais elevados da instalação, com efeito da sedação podem cair das plataformas resultando em lesões ou fraturas (19). Assim sendo, deve ser feita uma monitorização especialmente atenta da evolução do processo de anestesia e podem ser utilizadas redes ou camaroeiros para capturar o animal antes de este atingir o solo ou qualquer obstáculo que o possa lesionar (19). Após a indução anestésica as complicações podem estar relacionadas com o estado de saúde do animal, droga utilizada e quantidade anestésica (19). O facto de os primatas apresentarem uma elevada área corporal desprovida de pêlo implica um maior risco de hipotermia, assim, deve ser efetuada uma constante monitorização da temperatura corporal (19).

A resolução cirúrgica da fratura de fêmur da fêmea de mandril em questão envolveu então a fixação óssea com uma placa de titânio e dois fios de cerclage (Figura 10). O prognóstico do pós-operatório deste género de intervenções é por norma uma incógnita, dado que não é possível proporcionar completa estabilidade ao membro fraturado e asépsia regular da sutura, porque o animal não permite ser manipulado e a confinção do mesmo a uma área demasiado restrita põe em causa o seu bem-estar (19). Acrescentando o facto de se tratar de um animal inserido num grupo social com hierarquias bem definidas, em que se se mantiver afastado do seu grupo durante um longo período de tempo poderá vir a ter dificuldades de reintrodução.



Figura 10 - Cirurgia ortopédica a uma fêmea de mandril (*Mandrillus sphinx*), preparação pré-cirúrgica (à esquerda), colocação de parafusos na placa de titânio (à direita).

Em suma, os procedimentos cirúrgicos efetuados tiveram por base adaptações das intervenções nos animais domésticos, tendo em conta as diferenças fisiológicas, anatómicas e comportamentais que influenciam tanto o desenvolvimento da doença e sintomatologia, como tratamento cirúrgico, pós cirúrgico e possibilidade de recuperação do animal.

2.6. Necrópsias

As necrópsias são procedimentos essenciais num parque zoológico, tanto como meio de diagnóstico do caso concreto e análise da possibilidade de contágio e/ou infecciosidade da situação, como para estudo da biologia e anatomia dos próprios animais, devendo ser realizadas por rotina em instalações apropriadas.

Como tal, segundo o Gráfico 6 pode-se verificar que foram realizadas no total 26 necrópsias, das quais 21 (80,76%) foram realizadas em mamíferos e as restantes cinco (19,24%) em aves. Através da Tabela 18 verifica-se que nos mamíferos, o maior número de necrópsias foi observado em sítungas (*Tragelaphus spekii*), órix de Cimitarra (*Oryx dammah*) e porquinhos-da-Índia (*Cavia porcellus*) com quatro animais cada, seguida de três casos em cabras anãs (*Capra aegragus hircus*). Nas aves, das cinco necrópsias efetuadas, três foram na espécie *Agapornis sp.* e as outras duas num turaco (*Tauraco sp.*) e flamingo pequeno (*Phoeniconaias minor*).

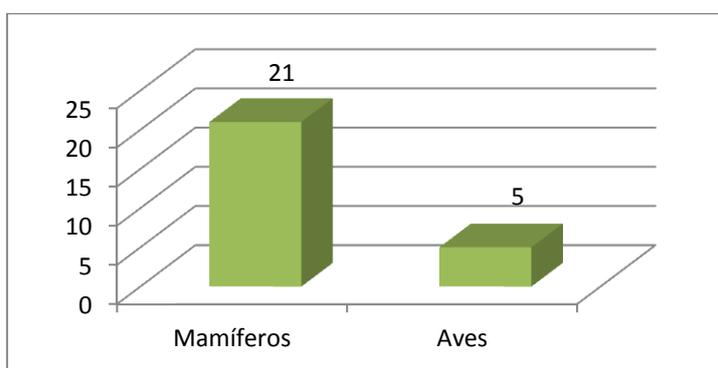


Gráfico 6 – Frequência absoluta das necrópsias realizadas na classe dos mamíferos e aves. $n=26$, em que n corresponde ao número total de necrópsias realizadas.

Tabela 18 – Frequências absolutas (Fi) e relativas (Fr) das necrópsias realizadas nos animais das diferentes classes. n=26, em que *n* corresponde ao número total de necrópsias realizadas.

	Espécie	Nome comum	Fi	Fr
Mamíferos	<i>Equus caballus</i>	Cavalo	1	3,85%
	<i>Equus asinus</i>	Burro	1	3,85%
	<i>Ovis aries</i>	Ovelha anã	1	3,85%
	<i>Capra aegragus hircus</i>	Cabra girgentana	3	11,54%
	<i>Cavia porcellus</i>	Porquinho da índia	4	15,38%
	<i>Macropus rufogriseus</i>	Caguru de <i>Bennet</i>	2	7,69%
	<i>Tragelaphus spekii</i>	Sitatunga	4	15,38%
	<i>Syncerus caffer nanus</i>	Búfalo do Congo	1	3,85%
	<i>Oryx dammah</i>	Órix de Cimitarra	4	15,38%
Aves	<i>Agapornis sp.</i>	Inseparáveis	3	11,54%
	<i>Tauraco sp.</i>	Turaco	1	3,85%
	<i>Phoeniconaias minos</i>	Flamingo pequeno	1	3,85%
	Total		26	100,00%

2.7. Transporte de animais

O transporte de animais pode ser motivado por trocas de animais entre instituições zoológicas, por défices ou excedentes de animais. Através do Gráfico 7, é possível comparar a entrada e saída de animais do parque, na medida em que, independentemente da classe, a saída de animais foi superior à entrada. Durante o período de estágio ocorreu a aquisição de cinco mamíferos e saída de 34, enquanto que nas aves, deram entrada 13 animais e saída de 39. Nas aves, o elevado número de animais transportados para o exterior do parque estava associado à remodelação da instalação do aviário, em que futuramente iria ocorrer a aquisição de novas aves exóticas. Nos mamíferos a saída de animais esteve maioritariamente relacionada com a existência de excedentes de determinadas espécies.

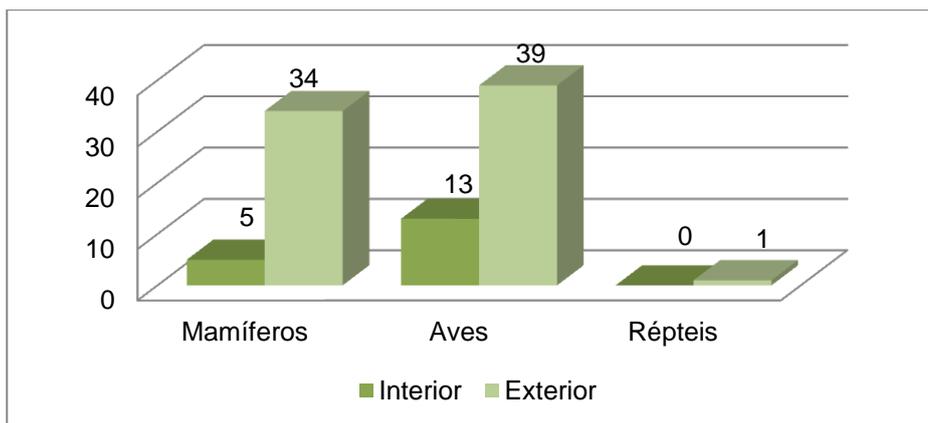


Gráfico 7 – Frequências absolutas dos animais transportados para o interior e exterior do parque de acordo com as classes dos animais. $n=92$, em que n corresponde ao número total de animais mobilizados

De facto, os animais adquiridos pertenceram maioritariamente à classe das Aves, na percentagem de 72,22%, como demonstra a Tabela 19, constituiu em oito galinhas de Angola (*Numida meleagris*), três faisões dourados (*Chrysolophus pictus*) e dois mutuns (*Crax rubra*). Na classe Mammalia, 27,78% corresponde a cinco porquinhos-da-Índia (*Cavia porcellus*) transportados para o interior do parque.

Tabela 19 – Frequências absolutas (F_i) e relativas (F_r) do transporte de animais das diferentes classes para o interior do parque. $n=18$, em que n corresponde ao número de animais transportados para o interior do parque.

Transporte – Interior					
Classe	Espécie	Nome comum	F_i	F_i (Classe)	F_r (Classe)
Mammalia	<i>Cavia porcellus</i>	Porquinho-da-índia	5	5	27,78%
	<i>Numida meleagris</i>	Galinha de Angola	8		
Aves	<i>Crax rubra</i>	Mutum	2	13	72,22%
	<i>Chrysolophus pictus</i>	Faisão dourado	3		
F_i			18		100,00%

Por sua vez, o transporte para o exterior do parque de mamíferos e aves (Tabela 20) foi quase equivalente, com 45,95% e 52,70%, respetivamente. Os répteis aparecem com um caso, que resultou em 1,35% dos transportes e correspondeu à colheita de ovos de tatarugas de esporas africana (*Centrochelys sulcata*), que foram encaminhados para outro parque zoológico para proceder à incubação dos mesmos. Para o exterior do parque também foram transportadas 39 aves, 22 inseparáveis (*Agapornis sp.*) e 11 avestruzes (*Strutio camelus*). Na classe Mammalia foram 11 muflões (*Ammotragus lervia*), oito chitais (*Axis axis*) e seis cobos de leche (*Kobus leche*).

Tabela 20 – Frequências absolutas (Fi) e relativas (Fr) do transporte de animais das diferentes classes para o exterior do parque. n=74, em que *n* corresponde ao número de animais transportados para o exterior do parque

Transporte – Exterior					
Classe	Espécie	Nome comum	Fi	Fi(Classe)	Fr(Classe)
Mammalia	<i>Capra aegragus hircus</i>	Cabra anã	3	34	45,95%
	<i>Capra girgentana</i>	Cabra girgentana	2		
	<i>Ammotragus lervia</i>	Muflão	11		
	<i>Kobus leche</i>	Cobo de leche	6		
	<i>Axis axis</i>	Chital	8		
	<i>Camelus dromedarius</i>	Dromedário	2		
	<i>Cervus elaphus hispanicus</i>	Veado Ibérico	2		
Aves	<i>Strutio camelus</i>	Avestruz	11	39	52,70%
	<i>Agapornis sp.</i>	Inseparáveis	22		
	<i>Trichoglossus haematodus</i>	Lóris arco íris	2		
	<i>Lamprotornis superbus</i>	Melro metálico	2		
	<i>Psittacula krameri</i>	Periquito rabo de junco	2		
Reptilia	<i>Centrochelys sulcata</i>	Tartaruga de esporas africana	1	1	1,35%
Fi			74	100,00%	

O transporte dos mamíferos da área do safari para o exterior do parque esteve associado a uma prévia imobilização química, com o objetivo de mobilizar os animais para uma instalação de menores dimensões e preparação para o transporte. É necessário realizar uma análise de risco antes do transporte do animal, dado que é criada uma situação diferente da rotina habitual, a qual pode resultar em *stress* físico, psicológico ou ferimentos. Outro fator a ter em conta antes do transporte são as condições ambientais, a escolha do dia e estação do ano deve ser feita evitando demasiado frio ou calor desnecessário (37).

Parte II: Pesquisa de hemoparasitas em ungulados

3. Introdução teórica

As hemoparasitoses são doenças transmitidas por vetores de difícil controlo, responsáveis por importantes perdas económicas e com potencial zoonótico (38; 39). Constituem o maior problema de saúde e de manejo nos sistemas de produção de bovinos e pequenos ruminantes em África, Austrália, Ásia e América latina (38; 39). A theileriose tropical, babesiose e tripanosomose são hemoparasitoses em que os agentes causais são protozoários, por sua vez a anaplasmose é causada por riquetsias (40).

Nas áreas endémicas, os bovinos autóctones desenvolveram resistência aos vetores e às doenças por estes transmitidas, contudo, a suscetibilidade de raças exóticas e a movimentação de animais provoca desequilíbrios nesses ecossistemas (39; 40). Para contrariar a incidência de casos clínicos deve ser efetuado controlo químico de ixodídeos, tratamento dos animais, quimioprofilaxia e vacinação, contudo o controlo químico é limitado por fatores económicos e devido ao aparecimento de resistências aos acaricidas (40).

Na Zâmbia, em 2012, foi realizado um estudo associado a transporte de animais que consistia na pesquisa de ixodídeos e hemoparasitas em esfregaços sanguíneos de 12 espécies de animais selvagens, num total de 95 animais (41). Em todas as espécies de animais foram identificados ixodídeos do género *Rhipicephalus*, sendo que em algumas foi o único género de ixodídeo encontrado (41). Os géneros *Amblyomma* e *Hyalomma* foram identificados em cinco espécies, no entanto não foi possível concluir sobre uma possível preferência de hospedeiro ou mero resultado da abundância do ectoparasita no local (41). A prevalência de hemoparasitas nos animais do estudo foi baixa, resultando numa taxa total de 7,37% (41). De tal forma que, o hemoparasita *Anaplasma marginale* foi identificado em impala (*Aepyceros melampus*) e puku (*Kobus vardoni*), enquanto que a *Babesia* sp. foi detetada em bauala (*Tragelaphus scriptus*) e puku, os piroplasmas de *Theileria* e *Trypanosoma congolense* foram observados no grande cudu (*Tragelaphus strepsiceros*) (41). Este estudo surgiu no seguimento de outro realizado previamente, em 2010, na Zâmbia, em que dentro de 14 espécies de animais selvagens foram detetadas formas tripomastigotas de *Trypanosoma brucei* em quatro kudus (*Tragelaphus strepsiceros*), num total de 153 amostras recolhidas (42). No entanto, é necessário ter em consideração que as baixas taxas de infeção observadas no estudo podem estar relacionadas com o método de deteção utilizado, já que os esfregaços sanguíneos não permitem detetar exposições prévias ao parasita e, assim, níveis baixos de infeção podem passar despercebidos (41). Como tal, caso tivessem sido utilizados métodos mais sensíveis, como biologia molecular, as taxas de infeção poderiam ter sido superiores (41).

Na verdade, a transmissão de agentes patogénicos entre animais selvagens e domésticos é um assunto de elevada importância na atualidade, tendo em conta os efeitos devastadores que esses agentes podem ter tanto na produção animal como na vida selvagem (43; 44). Estes acontecimentos acabam por estar inevitavelmente interligados pelo facto de se

estimar que estes animais partilham entre si cerca de três quartos dos agentes patogénicos (43; 44). Os hemoparasitas veiculados por ixodídeos são então um dos grupos de agentes patogénicos que podem ser transmitidos entre animais domésticos e selvagens, exigindo especial atenção tanto pela morbidade e mortalidade causada nos animais domésticos, como pelo facto dos animais selvagens poderem atuar como hospedeiros reservatórios dos hemoparasitas (45; 44). Como por exemplo, a febre da costa do leste, provocada pelo protozoário *Theileria parva*, tem como hospedeiro natural o búfalo africano no qual desencadeia uma infeção assintomática, mas quando presente nos bovinos domésticos pode provocar o desenvolvimento fatal da infeção (44). No mesmo contexto, o veado de cauda branca (*Odocoileus virginianus*) e o cervo (*Cervus nippon*) têm sido identificados como hospedeiros reservatórios de piroplasmas (*Babesia bigemina* e *B. ovis*) e riquetsias (*Anaplasma bovis*, *A. centrale*, *A. phagocytophilum* e *Ehrlichia spp.*) (44).

De facto, os mamíferos selvagens em África geralmente apresentam níveis elevados de resistência aos hemoparasitas e aos vetores que os transmitem, sendo que o búfalo africano (*Syncerus caffer*) é considerado um dos principais hospedeiros reservatórios de hemoparasitas (46). Com o intuito de aprofundar o assunto e conhecer os níveis de infeção dos animais no *Chobe National Park* e no delta do Okavango, em 2015, foram realizadas análises sanguíneas a 120 búfalos. Através de métodos de PCR-TR foi revelada a presença de infeções simples ou mistas de *Theileria*, *Babesia*, *Anaplasma* e *Ehrlichia* e através do recurso a IFAT em 74% das amostras foram obtidos resultados positivos à presença de anticorpos de *T.parva* (45).

Com base nos estudos descritos é possível verificar o potencial dos animais selvagens para atuarem como hospedeiros reservatórios de importantes hemoparasitoses, tornam-se a base da sobrevivência e disseminação dos hemoparasitas e dos seus hospedeiros invertebrados (38; 45). No entanto, é necessário continuar a investigar a presença destes parasitas nos bovinos domésticos para que sejam aplicados protocolos de controlo tendo em conta a co-existência de espécies selvagens e domésticas.

A ocorrência de hemoparasitoses em ungulados encontra condições perfeitas em Portugal, principalmente na região do Ribatejo e Alentejo (região em que se insere o Badoca Safari Park). Para além das condições atmosféricas propícias, as distribuições geográficas dos vetores sobrepõem-se frequentemente, permitindo a ocorrência de ciclos de vida de diferentes agentes etiológicos. Um conjunto de estudos citados por Guerra, D. et. al., em 2010, enunciam que foram registadas prevalências elevadas em bovinos no distrito de Setúbal, Beja, Évora, e Santarém com valores de *T. buffeli* de 69,9%, *T. annulata* 30,2%, *B. bovis* 2,2%, *B. bigemina* 1,2%, *B. divergens* 1,2%, determinadas especificamente por técnicas de PCR-TR (38). Na abordagem a nível nacional foi referido que 13,8% de uma amostra de 1104 animais estavam infetados com pelo menos dois agentes (38).

Perante tais informações e tendo em conta a coleção zoológica do Badoca Safari Park, que inclui uma grande diversidade de ungulados domésticos e selvagens, provenientes de

diversos locais, parques ou países, e perante o desconhecimento da situação epidemiológica do parque, surgiu a possibilidade de iniciar uma pesquisa sobre hemoparasitas nestes ungulados. Assim, nesta parte do trabalho serão abordadas as hemoparasitoses que podem afetar ungulados domésticos e selvagens, nomeadamente a tripanosomose, a theileriose, a babesiose e a anaplasmosse, sobre as quais é efetuada uma revisão relativa ao ciclo de vida dos hemoparasitas, patogenia, diagnóstico, tratamento e controlo. O estudo então realizado e aqui apresentado é meramente qualitativo, pretendendo assim, avaliar a possibilidade dos ungulados do parque atuarem como portadores destes hemoparasitas, através da observação de esfregaços sanguíneos realizados durante o período de estágio.

3.1. Ungulados

“Ungulados” é um termo não taxonómico, que define todos os mamíferos que possuem cascos correspondendo, como consequente, a herbívoros (4; 47). Os ungulados são agrupados em perissodáctilos, de dedos ímpares, onde se incluem as famílias *Equidae*, *Tapiridae* e *Rhinocerotidae* (4; 47). Os restantes grandes herbívoros são classificados como artiodáctilos, com dedos pares, onde se incluem as famílias *Hippopotamidae*, *Camelidae*, *Suidae*, *Tayassuidae*, *Tragulidae*, *Moschidae*, *Cervidae*, *Giraffidae*, *Bovidae*, e *Antilocapridae*, sendo que as últimas seis famílias pertencem à subordem Ruminantia (4; 47).

3.2. Vetores

Os ixodídeos e os agentes parasitários por estes transmitidos afetam a saúde a nível global, tanto animal como humana, estando associados a importantes perdas económicas. O facto de aproximadamente 80% da população mundial de bovinos estar exposta a infestações por carraças faz com que seja um desafio a criação de métodos de diagnóstico, tratamento e controlo dos parasitas (39; 48; 49; 50). Os ixodídeos pertencem ao filo *Arthropoda*, constituído por invertebrados e à classe *Arachnida*, em que os adultos apresentam quatro patas, peças bucais extensamente modificadas e ausência de antenas (51). A classe *Arachnida* é então dividida em duas famílias, *Argasidae* e *Ixodidae*. As carraças pertencentes à família *Argasidae* com relevância veterinária são dos géneros *Argas*, *Ornithodoros* e *Otobius* (39; 51). Por norma, os argasídeos vivem perto do seu hospedeiro preferido (ninhas, capoeiras, abrigos, estábulos) e os estágios do parasita alimentam-se apenas por um curto período de tempo, regressando, de seguida, para o seu abrigo, a fêmea realiza várias refeições e produz uma pequena quantidade de ovos após cada refeição (39; 51).

Segundo F. Jongejan e G. Uilenberg, 2004, aproximadamente 10% das atualmente conhecidas 867 espécies de carraças atuam como vetores de uma vasta quantidade de microrganismos patogénicos, protozoários, riquetsias, espiroquetas e toxinas a animais domésticos, selvagens e humanos (39). No entanto, os ixodídeos também exercem efeitos diretos através do processo de alimentação, como por exemplo, intoxicação, irritação, hipersensibilidade, alergias, paralisia e, quando em elevado número, podem surgir quadros de

anemia, perda de peso e posterior depreciação da qualidade das peles (39; 49; 52). O desenvolvimento e transmissão de hemoparasitas por ixodídeos é um fenómeno relacionado com o processo de alimentação, na medida em que em todos os ciclos de vida dos hemoparasitas a infeção inicial dos tecidos dos ixodídeos ocorre após a alimentação, nas células epiteliais da porção anterior do intestino (48; 53). Por sua vez, a transmissão do hemoparasita ao hospedeiro vertebrado acontece posteriormente ao desenvolvimento e multiplicação do parasita nas glândulas salivares (53).

As carraças e os hemoparasitas que estas transmitem surgiram num estado de equilíbrio com vários animais selvagens, que atualmente atuam como hospedeiros reservatórios (39). Esta situação apenas se tornou problemática para a produção animal quando o contacto entre animais domésticos e selvagens se tornou mais próximo, seja pela movimentação humana para zonas endémicas ou pela movimentação de animais infetados para zonas não endémicas (39). Um exemplo da movimentação humana para regiões endémicas é a introdução de bovinos em África, proporcionando o contacto com *Rhipicephalus appendiculatus*, vetor de *Theileria parva*, agente causal da febre da costa leste, em que o búfalo é o hospedeiro natural desta, não desenvolvendo portanto sinais clínicos (39). Como exemplo da mobilização de animais com carraças infetadas é a introdução de carraças do género *Boophilus* infetadas no continente americano (39).

Os ixodídeos para realizar o seu ciclo de vida, podem parasitar um, dois ou três hospedeiros (39). As larvas e as ninfas necessitam de se alimentar uma vez para ingurgitar e realizar a muda (39). As carraças de um hospedeiro (*Dermacentor sp.*, *Boophilus sp.*) realizam essas duas refeições no mesmo hospedeiro, de larva para ninfa, e ninfa para adulto, enquanto que as de dois hospedeiros (algumas espécies de *Rhipicephalus* e *Hyalomma*), entre as mudas, largam o hospedeiro e têm de seguida de encontrar de novo um hospedeiro para passar à fase adulta (39). As carraças de três hospedeiros (*Amblyomma sp.*, *Haemaphysalis sp.*, *Ixodes sp.*, *Rhipicephalus sp.* e a maioria das espécies de *Hyalomma*) não realizam as mudas no hospedeiro, na medida em que as larvas, após a alimentação, ingurgitam e largam o hospedeiro, realizam a muda, procuram outro hospedeiro, repetem o processo e a carraça adulta terá de encontrar um terceiro hospedeiro para se reproduzir (39). Os ixodídeos adultos reproduzem-se no hospedeiro e a fêmea depois de se alimentar, abandona o hospedeiro, liberta uma grande quantidade de ovos e morre, por sua vez, o macho permanece no animal durante vários meses (39). Logo, perante estes três ciclos de vida, verifica-se que o potencial infeccioso aumenta com o número de hospedeiros que o ixodídeo necessita de parasitar para completar o seu ciclo de vida, acrescentando o facto de uma fêmea de três hospedeiros libertar uma maior quantidade de ovos, comparativamente com uma carraça de um único hospedeiro (39). No animal, os ixodídeos são mais facilmente encontrados na região inguinal e órgãos genitais externos, pelo facto destes locais, para além de muito irrigados, apresentarem também pêlo curto e fino, o que permite uma melhor penetração das peças bucais na região vascular para alimentação (52).

O desenvolvimento e a transmissão de hemoparasitas por ixodídeos são influenciados por diversos fatores, como a espécie, estadió e sexo do ixodídeo, temperatura ambiente, estação do ano, sendo mais propício o desenvolvimento destes em climas temperados e secos e em regiões de pastagem natural, dependendo também da suscetibilidade dos animais de determinada região a infestações por carraças e da presença de infecções concomitantes (39; 51; 53). A resistência a estas infestações, ou pelo menos a capacidade de realizar uma resposta imunologicamente efetiva à infestação é determinada geneticamente (39; 51).

De acordo com os hemoparasitas que serão abordados de seguida e a Tabela 21, o ixodídeo do género *Amblyomma* encontra-se maioritariamente associado à transmissão de *Theileria mutans*; *Boophilus* de *Theileria equi*, *Babesia bovis*, *B. bigemina* e *Anaplasma marginale*; *Haemaphysalis* de *Theileria buffeli* e *Babesia sp.*; *Hyalomma* de *Theileria annulata*; *Ixodes* de *Babesia sp.*; *Dermacentor* de *Babesia sp.* e *Anaplasma marginale*; *Rhipicephalus* de *Theileria parva*, *Babesia sp.* e *Anaplasma marginale* (39).

Em Portugal, são conhecidas 24 espécies de carraças, em que 12 infetam os bovinos. Essas espécies pertencem aos géneros *Ixodes*, *Rhipicephalus*, *Hyalomma*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis* e *Ornithodoros* (51). As doenças mais relevantes transmitidas por carraças, particularmente na região do Ribatejo e Alentejo são babesioses devido a *B. bigemina* e *B. bovis*, theilerioses por *T. annulata* e anaplasmoses por *A. marginale*. As parasitoses de pequenos ruminantes transmitidas por carraças apresentam um menor impacto comparativamente às dos bovinos, porém casos de babesiose por *B. motasi* e *B. ovis* e theileriose por *T. hirci* também estão presentes em alguns distritos do país (54).

Em relação ao *Trypanosoma brucei*, este tem como vetor biológico artrópodes da classe Insecta, a mosca de tsé-tsé, a *Glossina sp.*, mosca hematófaga com capacidade de infestar 10 milhões de km² e afetando 37 países, principalmente em África (55). O protozoário *T. cruzi* aparenta estar mais associado a insetos da família *Reduviidae* (55).

Tabela 21 – Hemoparasitoses em ungulados, agente causal e hospedeiro invertebrado preferencial (38; 39)

Doença	Agente	Hospedeiro Invertebrado
Theileriose	<i>T. mutans</i>	<i>Amblyomma</i>
	<i>T. equi</i>	<i>Boophilus</i>
	<i>T. buffeli</i>	<i>Haemaphysalis</i>
	<i>T. annulata</i>	<i>Hyalomma</i>
	<i>T. parva</i>	<i>Rhipicephalus appendiculatus</i>
Babesiose	<i>B. bovis</i>	<i>Boophilus, Rhipicephalus</i>
	<i>B. bigemina</i>	
	<i>Babesia sp.</i>	<i>Dermacentor, Haemaphysalis, Ixodes, Rhipicephalus</i>

Anaplasmosose	<i>A.marginale</i>	<i>Boophilus, Dermacentor, Rhipicephalus</i>
Tripanosomose	<i>T.brucei brucei</i>	<i>Glossina</i>
	<i>T.cruzi</i>	Família <i>Reduviidae</i>

As moscas do género *Stomoxys*, também atuam como vetores mecânicos de agentes patogénicos presentes no sangue e pele dos animais, especialmente animais de produção e ocasionalmente humanos (56). Nos animais de produção as moscas exercem efeitos diretos como lesões de pele, *stress*, redução da ingestão de alimento, perda de sangue e efeito imunossupressivo. Também induzem a agregação de animais para proteção mútua, o que favorece o desenvolvimento de agentes patogénicos nos hospedeiros e a sua transmissão (56). Este género de moscas quando realiza uma segunda alimentação pode ainda inocular directamente sangue de outro animal que estava acumulado na sua probóscide, o que permite aos agentes patogénicos serem regurgitados (56). O mecanismo de alimentação destes insetos tem um impacto considerável na transmissão de doenças como anemia infecciosa equina, febre suína africana e vírus do nilo ocidental, riquetsias (*Anaplasma* e *Coxiella*), bactérias e parasitas (*Trypanosoma spp.*, *Besnoitia spp.*), entre outros (56).

Na Europa, os sistemas de produção animal alteraram a fauna disponível para os ungulados e as paisagens de floresta foram alteradas para campos de cultivo e pastagens artificiais (57). Consequentemente, processos como intensificação da produção animal e pastoreio atuam como vetores do aumento da biodiversidade, ao criar novas condições para a transmissão de parasitas e o seu desenvolvimento (57). Por sua vez, a agricultura, através do uso de inseticidas e herbicidas, também é responsável pela realização de um processo de seleção de espécies oportunistas, competitivas e de rápido crescimento, aumentando assim a possibilidade de disseminação de hemoparasitoses (57). Assim sendo, os tabanídeos, ectoparasitas cosmopolitas de ungulados, com grande capacidade de adaptação a diversos tipos de ambiente, ao contrário de certas moscas picadoras, como *Stomoxys* e *Haematobia*, podem assumir elevada importância como vetores mecânicos de hemoparasitoses. Segundo Baldacchino, et al, 2014, a espécie de tabanídeos com maior prevalência na Europa é *T.bromius* (57).

3.3. Tripanosomose

3.3.1. Caracterização

A tripanosomose é uma doença causada por protozoários da família *Trypanosomatidae*, nomeadamente do género *Trypanosoma*, pertencente à ordem Kinetoplastida e filo Sarcomastigophora, que consiste em protozoários flagelados, extracelulares, que se reproduzem por divisão binária, com capacidade de se movimentar e parasitar o sangue e/ou tecidos do seu hospedeiro (hemoflagelados) (55; 58). Exceções como o *T.cruzi* podem também optar por um ambiente intracelular (55; 58). As espécies *Trypanosoma congolense*, *T. vivax* e

T. brucei brucei têm maior afinidade intravascular (55; 58; 59). Com principal afinidade para os tecidos existe a espécie *T. uniforme* e *T. simiae* (55).

A tripanosomose resulta da infeção por um ou mais protozoários flagelados que se encontram principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. Grande parte das infeções são benignas porém algumas, especialmente as que envolvem os humanos e animais domésticos, podem resultar em doença severa (58). As espécies do género *Trypanosoma* podem parasitar todas as classes de vertebrados (59).

As espécies do género *Trypanosoma* são divididas entre as que realizam o desenvolvimento na porção posterior do trato digestivo do vetor (intestino posterior) que pertencem à secção Stercoraria e as que se desenvolvem na porção anterior do trato digestivo (boca e porção anterior do intestino), que se incluem na secção Salivaria. Com a exceção de *T. cruzi* todas as espécies patogénicas pertencem à secção Salivaria (58). As secções também variam na forma de transmissão e o tipo morfológico presente, em que na Salivaria a transmissão é feita por inoculação de formas tripomastigotas metacíclicas, enquanto na secção Stercoraria a transmissão ocorre por contaminação fecal de diversas formas de *Trypanosoma* (58).

O conhecimento sobre a epidemiologia da tripanosomose, especialmente a dinâmica de transmissão através dos vetores, é essencial para a elaboração de plano de controlo adequado (60). A essa necessidade acresce o facto de se tratar de uma zoonose com um elevado número de animais selvagens e domésticos a atuar como reservatório (60). Por sua vez, o conhecimento da prevalência do parasita numa população permite determinar o risco de transmissão de doença e assim aplicação de corretas medidas de controlo (60).

3.3.2. Ciclo de vida

Todas as espécies do género *Trypanosoma* têm um ciclo de vida heteroxeno ou pelo menos são transmitidas por vetores (exceto o *T. equiperdum* em que a transmissão é feita diretamente pelo coito dos cavalos) (58; 61). As várias espécies podem passar pelas formas amastigota, promastigota, epimastigota e/ou tripomastigota, com outras formas a desenvolverem-se no hospedeiro invertebrado (58; 61). A tripanosomose tem como agente causal diferentes espécies de *Trypanosoma*, as quais podem ser encontradas no sangue e outros tecidos de bovinos, animais selvagens e humanos (62).

Analisando, por exemplo, o ciclo de vida de *Trypanosoma brucei*, agente etiológico da tripanosomose animal (nagana) e humana (doença do sono). No hospedeiro vertebrado, encontra-se uma população pleomórfica de formas tripomastigotas, desde formas compridas e delgadas com um longo flagelo, intermédias, a curtas e robustas sem flagelo livre (59; 61). Quando sugados pela mosca suscetível (*Glossina sp.*), no momento em que esta se está a alimentar, *T. brucei* invade as células da porção anterior do intestino da mosca e inicia a sua multiplicação por divisão binária (55; 59). De seguida, as formas parasitárias migram em

direção ao esófago, faringe e hipofaringe e entram nas glândulas salivares, onde as formas tripomastigotas se transformam em epimastigotas (55; 59). As formas epimastigotas podem-se ligar às células do hospedeiro ou permanecer livres no lúmen, continuando a multiplicação do parasita e transformam-se, posteriormente, em formas tripomastigotas metacíclicas (curtas, robustas e sem flagelo livre), a forma infetante para o hospedeiro vertebrado (55; 59). Todo este processo no hospedeiro invertebrado dura entre 15 a 35 dias, dependendo da espécie de *Trypanosoma* e da temperatura ambiente, sendo mais curto no *T. congolense* e longo no *T.b.brucei* (55; 59; 62).

Durante o processo de alimentação do hospedeiro invertebrado, ocorre a deposição de formas metacíclicas de *Trypanosoma* (59; 62). No local de inoculação, em consequência da estimulação do sistema imunitário, forma-se um nódulo inflamatório que vai atuar como foco de multiplicação e persistência do parasita, antes da disseminação para a corrente sanguínea e linfonodos para continuar a replicação (62). Nos casos crónicos de tripanosomose os parasitas podem invadir o sistema nervoso central, multiplicar-se e penetrar nos espaços intercelulares no cérebro (59).

3.3.3. Epidemiologia

A tripanosomose é uma doença desencadeada pela presença de hemoparasitas num hospedeiro vertebrado e transmitida principalmente por moscas do género *Glossina* (*G. morsitans*, *G. pallidipes*, e *G. swynnertoni*) (58; 59; 62). Tem a capacidade de causar infeção severa em bovinos e humanos na África subsariana, o que resulta em perdas ao nível da produção animal com graves consequências socioeconómicas, exigindo elevados investimentos relativamente ao tratamento, prevenção e programas de controlo de vetores (42; 58; 62). Afeta também a produção agrícola nas áreas endémicas de infestação por *Glossina*, o que corresponde a uma área de 10 milhões de km² da zona tropical de África (62). Acrescentando o facto dos animais selvagens atuarem como hospedeiros reservatórios de várias espécies de *Trypanosoma*, o que dificulta o controlo das infeções (58). Como exemplo do cenário de um país africano, na Etiópia, estima-se que 10 a 14 milhões de bovinos e o equivalente conjunto de pequenos ruminantes, equídeos e camelídeos se encontrem em risco de infeção por espécies de *Trypanosoma* (62).

Dentro dos animais selvagens, o protozoário *Trypanosoma* tem como hospedeiro natural pelo menos 30 espécies, incluindo o grande cudu (*Tragelaphus strepsiceros*), facoquero (*Phacocoerus aethiopicus*), bauala (*Tragelaphus scriptus*), búfalo africano (*Syncerus caffer*), elefante africano (*Loxodonta africana*), rinoceronte branco (*Ceratotherium simum*), equídeos selvagens, leões (*Panthera leo*), entre outras (55). Normalmente os hospedeiros naturais não apresentam sinais clínicos, a não ser que seja quebrado o equilíbrio entre o parasita e o hospedeiro (55). Assim, a tripanosomose animal por norma só desenvolve sintomatologia em ruminantes introduzidos em zonas endémicas (55; 58; 59).

Epidemiologicamente é feito o agrupamento dos tripanosomas patogénicos nas doenças que provocam (59). A doença de chagas que afeta os humanos e outros mamíferos na América Central e do Sul é causada por *T.cruzi* e transmitida por insetos da família *Reduviidae* (59). Por sua vez, A doença do sono é uma zoonose transmitida por moscas do género *Glossina* (*Glossina morsitans*, *G. pallidipes*, e *G. swynnertoni*) infetadas com *T. brucei gambiense* e *T.b. rhodesiense* (55; 58; 59). As tripanosomoses que só afetam animais são as doenças com maior importância económica na produção animal em África e podem ser causadas por *T.brucei brucei*, *T.vivax* e *T. congolense* (59). Assim sendo, as espécies patogénicas para os animais não afetam os humanos, mas os animais podem atuar como hospedeiros reservatórios de *T. brucei gambiense* e *T.b. rhodesiense* (62). O ciclo de vida, patogénese, vetores e tratamento são semelhantes ao *T.brucei brucei*, no entanto, *T. congolense* tem a capacidade de provocar dano vascular pela sua capacidade de ligação à parede de pequenos vasos sanguíneos (59). Dentro da seção Salivaria ainda existem mais duas doenças, a surra provocada pelo *T. evansi* e *T. equinum*, e durina desencadeada por *T. equiperdum* (59).

De facto, em África, os animais parasitados com *T.vivax* podem variar entre infeções crónicas assintomáticas a casos agudos, e a transmissão ocorre maioritariamente segundo um desenvolvimento cíclico nas moscas de tsé-tsé (*Glossina sp.*) (63). No entanto, estes parasitas também podem ser transmitidos por outros artrópodes mordedores ou transmissão iatrogénica (63). Esta evidência permitiu a disseminação da infeção para além do local de prevalência de *Glossina sp.*, nomeadamente para a América Central e do Sul, onde a transmissão ocorre principalmente por tabanídeos (63). Na América do Sul, os bovinos infetados com *T. vivax* são maioritariamente assintomáticos, no entanto, segundo Batista, et al, 2007, a presença de *T.vivax* ou anticorpos contra este tem sido demonstrada em vários países da América Latina, em bovinos, búfalos e ovinos (63; 64).

Na Europa, a presença de vetores mecânicos, como o *Tabanus sp.* e *Stomoxys*, possibilita a transmissão deste hemoparasita do continente africano (56; 57).

3.3.4. Sinais clínicos

A variação e a severidade da doença são influenciadas por diversos fatores, nomeadamente as espécies de *Trypanosoma*, a sensibilidade do hospedeiro (raça, idade e sexo) e, principalmente, o método de infeção (natural ou artificial) (62; 65). Quando envolve tecidos normalmente está relacionada com a capacidade do parasita invadir espaços extracelulares e órgãos (65). Por exemplo, o *T.congolense* aloja-se nas células endoteliais de pequenos vasos sanguíneos e capilares, enquanto que as espécies *T.b.brucei*, *T.vivax*, *T.evansi* e *T.equiperdum* distribuem-se na circulação sanguínea, linfonodos e outros tecidos (65; 62). As espécies *T.congolense* e *T.vivax* são altamente patogénicas para os bovinos (62).

As tripanosomoses afetam inicialmente o local de inoculação formando um nódulo que atua como foco de infecção. As infecções agudas duram entre alguns dias a semanas, em que o animal pode morrer ou entrar numa fase subaguda a crônica, sendo que, também é possível desenvolver a fase crônica desde o início da infecção (59; 62). O decurso crônico da doença pode ser estável, com a possibilidade de ser interrompido por surtos periódicos de infecção severa, ou prosseguir para recuperação espontânea (62).

Os sinais clínicos básicos da fase aguda da afeção surgem oito a vinte dias após a infecção por *Trypanosoma*. Os animais podem apresentar febre intermitente ou de longa duração, anorexia, anemia, prostração e apatia, com perda de peso, diarreia e corrimento nasal e ocular (59; 62). Ocorre hipertrofia visível dos linfonodos superficiais, as mucosas ficam pálidas. Afeta também o ciclo éstrico, provocando irregularidades no ciclo e abortos, por sua vez, nos machos a qualidade do sêmen é progressivamente deteriorada (62). Em poucos dias os animais ficam emaciados, com falta de coordenação motora, paralisados, acabando por morrer (59; 62). Na verdade, infecções agudas por *T.vivax* também provocam coagulação intravascular disseminada (CID) com hemorragias (62).

3.3.5. Imunidade

O parasita desenvolveu um mecanismo de fuga às defesas imunitárias do hospedeiro, denominada de variação antigénica, resultado da dominância sucessivamente variável de cada tipo de antigénios. A remissão resulta na formação de anticorpos que normalmente destroem os tripanosomas homólogos, mas sempre que o hospedeiro produz esses anticorpos, ocorrendo quase a eliminação da infecção, é expressada uma nova variante específica da glicoproteína de superfície produzindo um novo tipo de antigénio que rapidamente se multiplica (59).

No desenvolvimento da tripanosomose ocorre uma alternância cíclica entre repetitivas remissões, com poucos tripanosomas e sinais de doença, e níveis muito elevados de parasitemia (59). Este ciclo tende a repetir-se até que o hospedeiro morra ou se torne assintomático (59).

3.4. Theileriose

3.4.1. Caracterização

Ordem Piroplasmorida

Analisando a taxonomia da ordem Piroplasmorida, esta pertence ao filo Apicomplexa, que consiste em protozoários intracelulares obrigatórios com a capacidade de se replicarem em diferentes células do hospedeiro, que estão agrupados em quatro ordens: Coccidia, Gregarinasina, Haemospororida e Piroplasmorida (49; 66). Estes protozoários não produzem esporos, flagelos, cílios ou pseudópodes e a sua locomoção, quando necessária, é conseguida pela flexão do corpo ou deslizamento. Quanto à reprodução, esta ocorre de forma assexuada, por divisão binária ou esquizogónia, dentro dos eritrócitos, ou em outras células sanguíneas dos mamíferos. A reprodução sexuada (gametogónia) ocorre no intestino do hospedeiro invertebrado sem que em nenhum dos estágios se produza pigmento intracelular. Os componentes do complexo apical são reduzidos mas característicos do filo Apicomplexa. Os parasitas da ordem Piroplasmorida realizam um ciclo de vida heteroxeno, com a merogónia no hospedeiro vertebrado e a esporogonia no invertebrado. A ordem divide-se assim em duas famílias, a *Babesiidae* e a *Theileriidae*, ambas com relevância veterinária (59). Os protozoários pertencentes a estas famílias podem ser encontrados nos linfócitos, histiócitos e eritrócitos do hospedeiro e apresentam morfologia redonda, ovóide ou irregular (49).

Na família *Theileriidae* encontra-se o protozoário do género *Theileria*. Este parasita é transmitido por ixodídeos e afeta uma variedade de animais domésticos e selvagens. Características como a realização de multiplicação assexuada (esquizogónia), tanto nos eritrócitos como em outras células e o facto de ocorrer transmissão transestadial (entre os estádios do ciclo de vida do vetor), diferenciam este protozoário do que mais se assemelha, a *Babesia sp.*, em que não é conhecido qualquer desenvolvimento extraeritrocitário (59).

As espécies de *Theileria* com importância económica que podem infetar bovinos e pequenos ruminantes são transmitidas por ixodídeos do género *Rhipicephalus*, *Amblyomma*, *Hyalomma* e *Haemaphysalis* (49; 59). Podendo também ocorrer transmissão iatrogénica (49).

3.4.2. Ciclo de vida

O protozoário *Theileria* apresenta um ciclo de vida complexo, como ilustra a Figura 11, com fases morfológicamente distintas em dois hospedeiros. A esporogónia e a merogónia decorrem no hospedeiro vertebrado, mamífero, enquanto que a formação do zigoto e cinete acontece no hospedeiro invertebrado, ixodídeo (67).

A infeção por *Theileria* geralmente ocorre quando uma carraça infetada, no momento em que se vai alimentar, introduz os esporozoítos presentes nas glândulas salivares num hospedeiro suscetível. Primeiramente ocorre a fase extraeritrocitária, em que os esporozoítos penetram nos linfócitos T e B, formando a esquizogónia que se desenvolve em esquizonte, dando origem aos denominados “corpos azuis de Koch”, os quais podem ser observados cerca de três dias após a infeção. Os esquizontes diferenciam-se em macroesquizontes podendo seguir duas linhas. Uma linha no sentido da expansão clonal, em que são produzidos macromerozoítos que atuam invadindo outras células linfáticas (gânglios, baço, fígado e sangue), formando uma nova geração de macroesquizontes. Noutra segunda linha os macromerozoítos que penetraram nos linfócitos tornam-se microesquizontes onde são produzidos os micromerozoítos. Quando ocorre a rutura celular, dependendo do local onde se encontram, em tecidos linfáticos ou na corrente sanguínea, os micromerozoítos vão respetivamente entrar em novas células linfáticas ou penetrar nos eritrócitos para dar origem aos “piroplasmas” típicos da doença (oito a dez dias após a infeção inicial). Aparentemente o parasita não se multiplica nos eritrócitos (49; 58; 59).

Os ixodídeos (larvas ou ninfas) são infetados quando ingerem os piroplasmas presentes nos eritrócitos (49). A libertação do protozoário e a fecundação dos gametócitos ocorre nos intestinos dos ectoparasitas, formando-se o zigoto, a única fase diplóide do ciclo (49; 68). De seguida, o zigoto divide-se em cinetes móveis que penetram nas células epiteliais do intestino, migrando através da hemolinfa infetando as glândulas salivares. Após a mudança de estadios da carraça e início da alimentação no hospedeiro, decorre a esporogonia com a multiplicação de esporozoítos nos ácinos das glândulas salivares e posteriormente injeção do parasita (68).

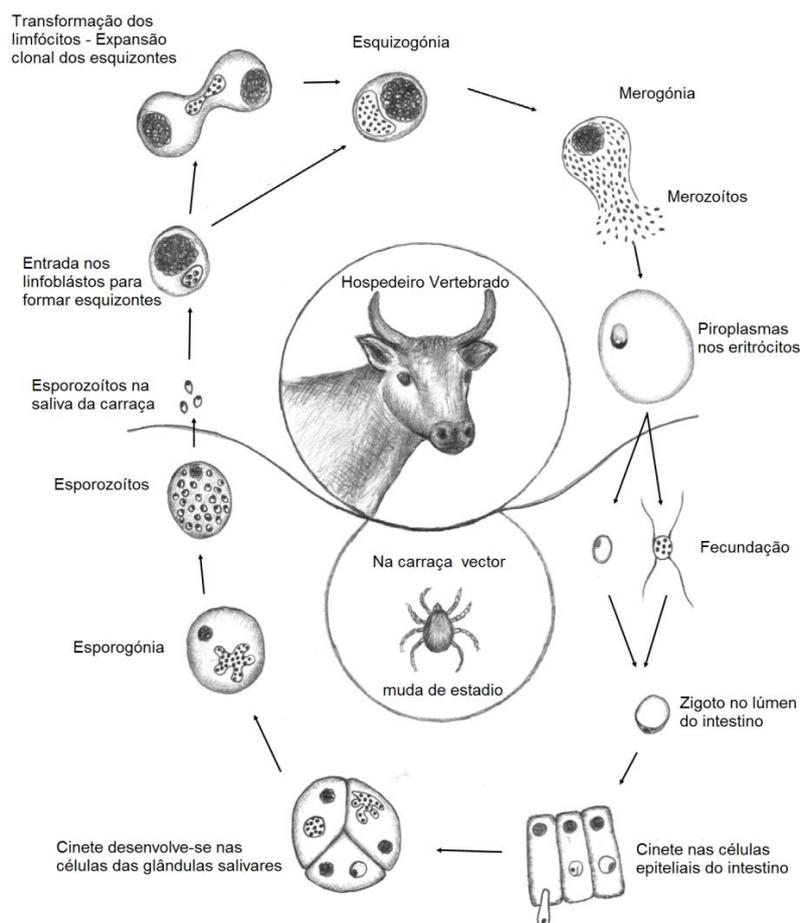


Figura 11 – Ciclo de vida generalizado de *Theileria*, usando a *T. parva* como exemplo. (Adaptado de B.J. Mans et al./*International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* 4 (2015) 104 – 118) (68)

O principal ixodídeo vetor de *T. parva* é o *Rhipicephalus appendiculatus*. No Sul de África tem-se principalmente o *R. zambeziensis* e em Angola o *R. duttoni*. A *T. annulata* é transmitida por carrapas do género *Hyalomma*. As carrapas podem-se manter infetadas na pastagem durante dois anos dependendo das condições climáticas, porém a doença não se mantém na ausência destes vetores (69).

3.4.3. Epidemiologia

A epidemiologia de *Theileria* é influenciada pela distribuição do parasita e do vetor, mortalidade e morbidade de surtos de doença, existência de medidas de controlo, fatores socioeconómicos e resistência e suscetibilidade do hospedeiro vertebrado (68). De tal forma que a incidência da doença é sazonal, sendo influenciada por fatores ambientais e existência de vetores, na medida em que o risco de infeção aumenta quando há maior atividade dos ixodídeos, o que ocorre principalmente durante o verão (49). É necessário ter também em consideração que uma única carrapa pode desencadear uma infeção fatal (49).

Nos animais domésticos, a theileriose bovina foi registada em todos os continentes e é causada, pelo menos, por seis espécies. Muitas espécies de *Theileria* têm sido reportadas nos

animais selvagens, nomeadamente no búfalo africano (*Syncerus caffer*) que aparenta ser o hospedeiro natural da *Theileria parva*, *T.mutans* e *T.velifera* (58). O antílope elande (*Taurotragus oryx*) aparenta ser o hospedeiro natural de *T.taurotragus* e o búfalo asiático de *T.annulata* e *T.orientalis* (58).

As duas espécies de *Theileria* mais patogénicas e, conseqüentemente com maior importância económica são a *T.parva* e *T.annulata*, apresentando uma mortalidade entre 90% a 100%, enquanto que nas espécies com baixa patogenicidade a mortalidade ronda os 23% (59). Na verdade, a theileriose provocada por *T. parva* surge em 14 países do Este, Centro e Sul de África, como Quênia, Burundi, Tanzânia, Malawi, Moçambique, Zâmbia, Uganda e Zimbabué, sendo assim considerada a principal infeção dos bovinos veiculada por ixodídeos em África. Por outro lado, a *T. annulata* encontra a sua maior expressão no Sul da Europa (Portugal, Espanha, Itália, Bulgária, Grécia e Turquia), Norte de África e Ásia (Índia, China e Ásia Central) (49; 52).

A espécie de *Theileria parva*, agente causal da febre da costa do leste (FCL), também conhecida como doença de Corridor tem como principal vetor os ixodídeos do género *Rhipicephalus* (49; 59). Infeções subclínicas podem ser encontradas em bovinos domésticos e búfalo asiático, por sua vez o búfalo africano e o cobo de água (*Kobus ellipsiprymnus*) aparentemente não desenvolvem a doença, sendo então considerados hospedeiros reservatórios (59; 69). A FCL, caracterizada por hipertrofia dos linfonodos superficiais e pirexia, apresenta níveis de mortalidade anuais no Este, Centro e Sul de África a rondar um milhão de bovinos, sendo que 25 milhões de animais em África estão em risco de infeção (49). Logo, esta doença limita a introdução de raças melhoradas na medida em que afeta principalmente animais exóticos e bovinos de raça cruzada, registando-se também em raças indígenas e animais adultos em áreas endémicas instáveis (49; 70).

Em termos históricos, a FCL foi pela primeira vez descrita no Este de África, em 1910, como *Amakebe*, por Bruce et al., que a descreveu como uma doença endémica, moderada, que afetava apenas os animais jovens (71; 72). Simultaneamente, a peste bovina foi responsável por perdas de 2,5 milhões de bovinos na África do Sul, tendo sido erradicada em 1899 (72). Esta doença associada às conseqüências da segunda guerra dos Bôeres (1899-1902) implicou um aumento da importação de bovinos provenientes de diversos locais como Quênia e Tanzânia (72). Sendo o Este de África endémico de FCL, a mobilização de animais autóctones resistentes e vetores para outro local originou um novo surto (72). Deste modo, a doença foi apenas reconhecida com a chegada dos colonos europeus com animais exóticos ao Este de África, em 1901 e 1902, tendo-se concluído que a peste bovina e a febre da costa leste se tratavam da mesma doença (72). Por outro lado, com o crescente conhecimento da doença pode-se afirmar que tanto na theileriose como na babesiose os jovens apresentam uma maior resistência ao desenvolvimento da doença em relação aos animais adultos, não sendo portanto os animais mais suscetíveis (59).

A theileriose tropical, também conhecida como febre da costa mediterrânea, é desencadeada pela presença do protozoário *T. annulata* e tem como vetores ixodídeos do

género *Hyalomma* (49). Afeta bovinos e iaques (*Bos grunniens*), com infeções medianas observadas no búfalo asiático, o qual é considerado o hospedeiro natural do parasita. Por sua vez, a nível global, cerca de 250 milhões de bovinos estão em risco de ser infetados com theileriose tropical (49). É uma doença progressiva, linfoproliferativa e fatal, iniciada pela transformação de células infetadas por macroesquizontes nos gânglios linfáticos que drenam o local de inoculação do parasita (69; 73).

Outra espécie de *Theileria* com importância económica é *T. lestoquardi* (*T. hirci*) que tem a capacidade de desenvolver doença em pequenos ruminantes, surgindo na bacia Mediterrânea, Norte de África e Ásia (69). A espécie *Theileria orientalis* é geralmente não patogénica, apesar de serem conhecidas algumas variações nas espécies. *Theileria mutans* e *T. taurotragi* também não são patogénicas em áreas endémicas estáveis (58).

Na Europa, concretamente, a mortalidade em ruminantes associada a infeções por *T.p. parva* por vezes chega aos 90% e os casos reportados de infeção por *T.annulata* podem atingir os 70% nos bovinos leiteiros (58). Porém, como descrito anteriormente os bovinos nascidos e mantidos em áreas endémicas onde as infeções são frequentes aparentam ser resistentes à doença (58; 74).

Em Portugal, existem poucos estudos sobre a prevalência de *Theileria spp.*, no entanto, segundo Branco et al., 2010, a theileriose tropical é considerada uma infeção endémica com patologia moderada nos bovinos, em que os registos resultam da identificação regular do parasita em esfregaços sanguíneos recolhidos de animais assintomáticos (74). Por sua vez, num estudo realizado pelos mesmos autores foi comprovada a associação de *T.annulata* como agente causal de uma doença recentemente identificada em Portugal (74).

3.4.4. Sinais clínicos

Os sinais clínicos de theileriose variam de acordo com as espécies de *Theileria* envolvidas, suscetibilidade do hospedeiro, quantidade de esporozoítos inoculados e período de incubação, que por norma é entre 10 a 15 dias (58; 49).

A doença de corredor, causada por infeção por *Theileria parva lawrenci*, é caracterizada por um reduzido número de esquizontes nos linfócitos e piroplasmas nos eritrócitos (59; 58; 68). Em comparação, o protozoário *T.p. parva*, agente causal da febre da costa do leste, em infeções agudas, apresenta um elevado número de esquizontes nos linfócitos e piroplasmas eritrocitários que provocam, numa fase inicial, tumefação do gânglio linfático que drena a área picada, seguida de uma leucocitose generalizada e, conseqüente hiperplasia generalizada dos linfonodos e tecidos linfáticos (59; 58; 68). Os sinais clínicos de FCL incluem então linfadenopatia com infeção respiratória secundária, hipertermia, depressão do sistema imunitário, anorexia e fraqueza, podendo também ser observados lacrimejamento, opacidade da córnea, corrimento nasal e diarreia (52; 58; 59; 68). Nesta doença, os capilares do sistema nervoso central são bloqueados por células infetadas o que resulta em sintomatologia nervosa (52). Normalmente não provoca hematúria nem anemia, mas, por vezes é encontrado sangue

nas fezes. Nos estados terminais da infecção, os animais encontram-se em decúbito, existindo uma leucopenia severa associada a imunossupressão e sinais agudos de septicemia e dispneia (59; 58; 68; 75). A morte resulta de asfixia seguida de edema pulmonar, sendo também possível observar, em exames histopatológicos, focos de infecção do tecido linfóide do córtex renal e nas células em redor de úlceras na parede da mucosa abomasal (59; 58; 68).

Nos casos de theileriose tropical, por *T. annulata*, a extensa parasitemia, provocada pelos piroplasmas intraeritrocitários, leva ao desenvolvimento de anemia hemolítica, que é característica da fase terminal da doença em conjunto com diarreia e desinteria, encontrando-se o animal em decúbito lateral (52; 73). Outros sinais de infecção incluem hipertermia, fraqueza, perda de peso, petéquias conjuntivais, adenomegália (52) .

Sintomas como febre alta estão associados a infecções por *T. parva* e *T. annulata*, podendo durar até à morte do animal (58; 75). Infecções com *T. mutans* e *T. orientalis* são caracterizadas por uma elevada taxa de multiplicação dos piroplasmas intraeritrocitários em que os períodos febris são curtos, seguidos de anemia e icterícia (58).

Sinais clínicos de *T. cervi* em veados-de-cauda-branca são raros, tendo apenas sido relatados casos de anemia sem causa aparente (58). Estudos anteriores revelaram que pode gerar doença no animal ou morte, caso este se encontre imunodeprimido ou malnutrido (58).

3.4.5. Imunidade

A imunidade contra *Theileria* depende se no animal já desenvolveu a fase extraeritrocitária do ciclo de vida do parasita. Deste modo, animais que recuperem de theileriose ficam imunes a próximas infecções mas permanecem portadores. A imunidade é mediada por células e inclui a destruição de linfócitos infetados por células T citotóxicas e células *natural killers*. Como tal, as infecções com piroplasmas por si só, sem que ocorra previamente infecção extraeritrocitária, não estimulam a proteção contra uma próxima infecção (58; 59; 69).

3.5. Babesiose

3.5.1. Caracterização

A babesiose é uma doença provocada pela infeção por um parasita do género *Babesia* sp., pertencente ao filo Apicomplexa, ordem Piroplasmorida, subordem Piroplasmorina e família *Babesiidae* (58; 59). A *Babesia* é um protozoário intraeritrocitário piriforme, ovóide ou esférico (58; 59). Historicamente, a classificação das babesias foi feita através de dois métodos: um método que consistiu na avaliação do tamanho relativo e forma dos trofozoítos nos eritrócitos e o número de merozoítos; o outro método de identificação baseia-se no hospedeiro natural (76). Em relação ao tamanho existem então dois grupos, as grandes babesias (*B. bigemina* e *B. cavalli*) e pequenas babesias (*B. bovis*, *B. microti*, *B. equi*, e *B. gibsoni.*), não tendo em conta a relação filogenética (58; 59; 76). A identificação com base no hospedeiro natural tinha como princípio a especificidade que se suspeitava que estes parasitas apresentavam em relação ao hospedeiro, o que não se verifica em algumas espécies de *Babesia* (76). Atualmente, através da caracterização por genética molecular, os piroplasmas deveriam ser divididos em cinco ou seis grupos: um que inclui as pequenas babesias de vários roedores selvagens, felídeos, canídeos e mamíferos de dimensões médias, denominado de archaeopiroplasmídeos ou grupo *Microti*; outro grupo inclui parasitas de cervídeos, canídeos e humanos, denominado de prototheilerídeos ou grupo *Duncani*; um grupo de babesídeos que parasitam canídeos, bovídeos e cervídeos; os unguilibabesídeos presentes em bovídeos, equídeos e ovinos; e um grupo de theilerídeos que inclui os hemoparasitas *Theileria* e *Cytauxzoon spp.* (76).

As principais espécies de *Babesia* que causam babesiose em ruminantes são a *B. bovis*, *B. bigemina* e *B. divergens* (77). Outras babesias que podem infetar os bovinos incluem a *B. major*, *B. ovata*, *B. occultans* e *B. jakimovi* (77). De facto, suspeita-se que a *Babesia* seja o segundo parasita mais comum a afectar a bovinos, depois do *Trypanosoma* (78).

3.5.2. Ciclo de vida

Todas as espécies de *Babesia* têm como hospedeiro invertebrado e vetores carraças da família *Ixodidae*. Os principais vetores de *B. bovis* e *B. bigemina* são ixodídeos do género *Rhipicephalus* (*Boophilus*) e de *B. divergens* é o *Ixodes ricinus* (77). Estes hemoparasitas podem também ser veiculados por *Dermacentor* e *Haemaphysalis* (38). Na *Babesia sp.* não é conhecido qualquer desenvolvimento extraeritrocitário e a transmissão, para além de transestadial, é também transovárica, transmitindo assim as formas parasitárias a numerosos descendentes (59).

No intestino e hemolinfa do hospedeiro invertebrado ocorre a reprodução sexuada da *Babesia* (58). De facto, a transmissão transovárica ainda não se encontra completamente compreendida, no entanto assume-se que, por exemplo, quando uma fêmea adulta de *Boophilus* se vai alimentar no hospedeiro vertebrado ingere as formas intraeritrocitárias de *B. bovis* (58; 59; 79). A gametogénese e a formação do zigoto ocorrem então no lúmen da

porção anterior do intestino da carraça e o cinete daí formado é libertado do intestino para a hemolinfa, invadindo os tecidos da fêmea, incluindo os ovários (58; 59; 79). Deste modo, conclui-se que a fêmea de *Boophilus* não transmite diretamente *B.bovis* à descendência, pois é o cinete que se desloca transovaricamente para a larva, com o objetivo de se multiplicar nos ácinos salivares da mesma, com produção de novas formas infetantes, esporozoítos, que serão transmitidos ao hospedeiro vertebrado quando esta se for alimentar, completando assim o ciclo (58; 59; 79). Na transmissão transtadial, o desenvolvimento dos esporozoítos nas glândulas salivares das carraças ocorre no estadio seguinte do ixodídeo, após o início da alimentação no hospedeiro (58; 59).

Quando o hospedeiro vertebrado é infetado, através da picada de um ixodídeo parasitado, são libertados os piroplasmas de *Babesia* (esporozoítos). Como não ocorre fase extraeritrocitária, os esporozoítos penetram imediatamente nos eritrócitos e multiplicam-se por divisão binária, dando origem a trofozoítos, sem que ocorra a formação de vacúolo parasitóforo. A célula parasitada eventualmente rutura, libertando os novos merozoítos formados, que irão infetar outros eritrócitos (58; 59).

3.5.3. Epidemiologia

A babesiose bovina tem como agente causal o protozoário *Babesia*, o qual é considerado um dos agentes patogénicos transmitidos por artrópodes com maior importância económica nos sistemas de produção a nível global (80). As espécies de *Babesia* mais virulentas são a *B.bovis*, *B. bigemina* e *B. divergens* (81). A babesiose bovina por *B.bovis* e *B.bigemina* é atualmente considerada endémica nas regiões tropicais e subtropicais da Austrália, África, Ásia, sul da Europa e América central e sul, em que os ixodídeos do género *Rhipicephalus* e subgénero *Boophilus* servem de vetores (77; 79; 81). Por sua vez, a *B. divergens* é economicamente importante em alguns países da Europa e norte de África (77; 81).

Os protozoários *B. bovis* e *B. bigemina* parasitam essencialmente bovinos, búfalos asiáticos (*Bubalus bubalis*) e búfalos africanos (*Syncaerus caffer*) (77). Casos clínicos de babesiose em ruminantes selvagens em regime extensivo são aparentemente raros, sendo que os casos documentados fazem apenas referência a caprinos e referem como agente causal a *B. capreoli* ou *B.bovis* (82). Adicionalmente, as infeções por *Babesia* nos animais selvagens podem-se tornar fatais quando associadas a práticas de manejo stressantes para os animais (83).

A estabilidade enzoótica da babesiose mantém-se principalmente pelos bovinos infetados subclínicamente que recuperaram da doença (77; 84). A morbilidade e mortalidade variam consideravelmente e são influenciadas pelos tratamentos efetuados na área, exposição prévia do parasita e estado vacinal (77). Em áreas endémicas, os bovinos podem ser infetados enquanto jovens, entre os seis e nove meses, desenvolvendo imunidade (84). Porém, podem ocorrer surtos em áreas endémicas, se a exposição de carraças aos jovens for interrompida ou

se houver introdução de novos animais sem imunidade (77; 84). A introdução de carrças infectadas com *Babesia sp.* em áreas anteriormente livres do parasita ou endemicamente estáveis pode também resultar em surtos da doença (77).

Na Europa, três espécies de *Babesia* têm particular interesse em ruminantes, a *B.divergens*, *B.capreoli* e *B. venatorum*. A *B.divergens* é o principal agente de babesiose bovina na Europa, parasitando bovinos e renas (*Rangifer tarandus*), podendo também infectar carnívoros, primatas e roedores (77; 82). Segundo Michel, A.O., 2014, espécies de *Babesia* foram reportadas em corços em vários países da Europa, incluindo França, Alemanha, Eslovénia, Espanha e Polónia (82).

Por outro lado, a babesiose é considerada uma zoonose em que, segundo Herwaldt, B. L. et al., 2003, o primeiro caso humano, corretamente documentado, foi um caso fatal em 1956 num homem asplénico na antiga Jugoslávia (85). Desde essa altura foram reportados centenas de casos de babesiose na América do Norte e aproximadamente 30 na Europa (85). A babesiose humana também pode ser transmitida por transfusão sanguínea, o que aumenta as preocupações relativas à saúde pública (83). Associada à grande diversidade de espécies reportadas como hospedeiros de *Babesia*, todos os vertebrados podem atuar como portadores do parasita, desde que sejam hospedeiros adequados para os ixodídeos vetores de *Babesia* (83).

3.5.4. Sinais clínicos

As infeções por *Babesia bigemina* caracterizam-se por uma maior severidade em animais adultos, na medida em que as crias com menos de um ano raramente são afetadas de forma severa, enquanto que as taxas de mortalidade em animais adultos, nos casos agudos não tratados, atingem os 50% a 90% (59). O período de incubação varia entre oito a quinze dias, mas os animais afetados de forma aguda podem morrer em apenas quatro a oito horas após a infeção (59).

Os esporozoítos de *Babesia* libertados das carrças infectadas durante o processo de alimentação invadem os eritrócitos do animal, transformando-se em merozóitos (81). A reprodução assexuada dos merozóitos nos eritrócitos provoca hemólise das células, o que resulta num quadro de anemia hemolítica severa, considerada a manifestação clínica típica da doença (77; 81). O primeiro sinal clínico da doença é pirécia (41-42°C) que pode durante uma semana ou mais, os animais infectados rapidamente ficam deprimidos, apáticos, perdem o apetite e apresentam as mucosas pálidas ou ictéricas (58; 59; 77; 79). Em algumas espécies, hemoglobínemia, hemoglobinúria, taquicardia e taquipneia acompanham a rápida destruição das células eritrocitárias. A urina apresenta uma coloração vermelha escura, sugestiva de babesiose (58; 59; 77).

O quadro clínico de infeções por *B.bovis* pode incluir sintomatologia nervosa e respiratória, em consequência do sequestro dos eritrócitos nos de capilares de órgãos internos

vitais (81). Ocorre assim bloqueio e anoxia cerebral, que é refletido em ataxia, alterações comportamentais, resultando, na maioria das vezes, na morte do animal (59; 77; 79). De facto, a *Babesia bovis* geralmente é mais patogénica que *B. bigemina* ou *B. divergens* (59; 77). Em casos agudos a parasitémia por *B.bovis* na circulação sanguínea é muitas vezes inferior a 1%, enquanto que nas outras duas espécies frequentemente ultrapassa os 10%, podendo ser superior a 30% (59; 77).

Em relação às espécies menos patogénicas de *Babesia* ou hospedeiros mais resistentes, as infeções podem ser subclínicas ou caracterizadas por febre, anorexia e icterícia ligeira (59). Nos casos crónicos, os animais permanecem com baixa condição corporal, fracos e deprimidos durante várias semanas até recuperarem (59).

A babesiose bovina é então considerada uma doença que afeta principalmente animais domésticos em comparação com espécies selvagens (59). De facto, infeções experimentais de animais selvagens em cativeiro com *Babesia spp.* não resultaram no desenvolvimento de sintomatologia, porém estes animais podem demonstrar sinais clínicos de babesiose semelhantes às espécies domésticas quando colocados em cativeiro em áreas não nativas (86).

3.5.5. Imunidade

Durante os primeiros meses de vida, as crias são protegidas através da imunidade passiva, adquirida pela ingestão de colostro materno (84). Em zonas endémicas, se as crias forem infetadas entre os três e nove meses de idade desenvolvem uma imunidade consistente sem apresentação de sinais clínicos (84). A imunidade poderá ser reduzida se a cria se encontrar imunocomprometida (84). Portanto, esta situação de aquisição de imunidade através do colostro exige elevados níveis de prevalência da infeção nos animais, assim como um elevado número de população de ixodídeos para garantir que as crias ficam infetadas durante o período crítico (86). Também são verificadas ligeiras reações cruzadas de produção de anticorpos entre *B. bigemina* e outras espécies de *Babesia* (59).

3.6. Anaplasmoses

3.6.1. Caracterização

A anaplasmoses bovina é causada por um parasita intracelular transmitido por carrapatos, o *Anaplasma marginale* (87). Em 2001 a classificação desta bactéria foi reorganizada, pertencendo atualmente à família *Anaplasmataceae*, ordem Rickettsiales (88). Estes organismos são classificados como intracelulares obrigatórios, encontrando-se exclusivamente dentro de vacúolos no citoplasma das células do hospedeiro (88; 89). O género *Anaplasma* inclui três espécies patogénicas para ruminantes, *A. marginale*, *A. centrale* e *A. ovis* (88).

3.6.2. Epidemiologia

A anaplasmoses bovina é responsável por perdas significativas nos sistemas de produção de bovinos de leite e carne a nível mundial (87; 90). As perdas resultam da diminuição do ganho médio diário e produção de leite, abortos e mortalidade (87). A espécie *A. marginale*, ao contrário do *A. phagocytophilum*, é bastante específica no que diz respeito ao hospedeiro, infeta apenas ruminantes, causando doença primária em bovinos (91).

Geralmente, a transmissão biológica de *A. marginale* é feita por ixodídeos, nomeadamente *Boophilus spp.*, algumas espécies de *Dermacentor*, *Ixodes ricinus* e *Rhipicephalus spp.* (88). Nos ixodídeos ocorre transmissão transestadial e no hospedeiro vertebrado tem sido reportada transmissão transplacentária (87; 91). A propagação da infeção também pode ser mecânica, através de artrópodes mordedores (ex. *Tabanus* e *Stomoxys*) ou contaminação de fomites (associada a atividades de manejo ou de sanidade, como procedimentos cirúrgicos e médicos, como as vacinações e desparasitações), sendo que a última pode ser o único meio de transmissão de *A. marginale* em áreas onde não existem vetores ou estes são incompetentes para transmitir a espécie de *Anaplasma* local (38; 87; 91)

Quanto à distribuição *A. marginale* pode ser identificado nas regiões tropicais e subtropicais da Europa, África, Ásia, Austrália, América do Sul e Central (87; 88; 91). Em Portugal, estão descritas duas espécies de *Anaplasma*, *A. marginale* subespécie *centrale* e *A. marginale* (38). Segundo Kocan, K.M., et al., 2010, vários isolados geográficos foram encontrados também na América do Norte e Sul, os quais diferem na sua morfologia, sequência proteica, características antigénicas e capacidade de transmissão através das carrapatos (91). No ano de 2011, foram registados pelo Bureau Interafricano de Recursos de Animais da União Africana (BIRA-UA) 983 surtos de anaplasmoses bovina, com 22,323 casos registados e 872 mortes, no entanto, estes valores podem estar subvalorizados por um possível número de casos não reportados (87). A importação de bovinos de zonas temperadas para regiões de África, com a intenção de melhorar a produção de leite e carne, pode resultar em perdas significativas por doença se não forem aplicadas medidas preventivas (ex. vacinação) (87). Por sua vez, é expectável que a distribuição de anaplasmoses continue a ser

alterada, não só pela mobilização de animais como também por efeito secundário do aquecimento global, que influencia a atividade dos hospedeiros invertebrados (91).

A anaplasiose clínica ocorre principalmente em bovinos domésticos, mas outros ruminantes incluindo o búfalo asiático (*Bubalus bubalis*), bisonte americano (*Bison bison*), veado de cauda branca (*Odocoileus virginianus*), veado mula (*Odocoileus hemionus*), entre outros, podem ficar infetados por *A. marginale*. Espécies de animais selvagens persistentemente infetados são importantes fatores epidemiológicos de disseminação de anaplasiose, ao serem portadores de eritrócitos infetados para os vetores mecânicos e biológicos (89; 91). Para um melhor conhecimento da prevalência da infecção em Espanha, foi realizado um estudo por de la Fuente, J. et al., em 2007, em que foram testados 17 corços para a presença de anticorpos de *Anaplasma sp.*, através do método ELISA por competição (89). Os resultados obtidos revelaram que 83% dos animais estudados eram portadores de anticorpos reativos para *Anaplasma sp.*, o que sugere que esta espécie poderá estar envolvida no ciclo de vida natural destas riquetsias na região, atuando como hospedeiro reservatório para a transmissão a outras espécies selvagens e domésticas (89).

3.6.3. Ciclo de Vida

Após a inoculação pelo vetor, estas bactérias infetam os eritrócitos do hospedeiro vertebrado, desenvolvendo inclusões intracelulares de quatro a oito microorganismos (38). Posteriormente, as riquetsias de *Anaplasma* abandonam os eritrócitos por exocitose e invadem outros, os quais podem posteriormente ser ingeridos por um ixodídeo vetor (38). Os eritrócitos infetados ingeridos pelo ixodídeo são digeridos e libertam as bactérias que se vão desenvolver nas células intestinais (38). Depois do desenvolvimento e maturação das riquetsias nas células do intestino, podem também infetar outros tecidos, como as glândulas salivares (91). Em cada local de infecção desenvolvem-se vacúolos ou colónias ligadas à membrana, sendo que a primeira forma é reticulada (vegetativa) e divide-se por divisão binária, dando origem a numerosas colónias que podem conter centenas de organismos (91). A forma reticulada muda para a densa, a qual é a forma infetante, com capacidade de sobreviver fora das células (91). Assim, os bovinos ficam infetados com *A. marginale* quando as formas densas, presentes nas glândulas salivares, são transmitidas ao hospedeiro durante a alimentação da carraça (91).

O período pré-patente depende da dose infetante, variando entre 7 a 60 dias, com uma média de 28 dias (91). Após a infecção eritrocitária ser detetada pelo organismo, o número de eritrócitos parasitados aumenta geometricamente, sendo subsequentemente fagocitados pelas células reticuloendoteliais nos bovinos (91).

3.6.4. Sinais clínicos

Todos os bovinos são suscetíveis a infecções por *A.marginale*, no entanto, o desenvolvimento de sinais clínicos depende da idade do animal no momento da infecção, raça, virulência da espécie, abundância de vetores e outros fatores que afetam a saúde do animal, como o manejo (92). Geralmente, quando os animais são infetados com menos de seis meses de idade não desenvolvem um quadro clínico da doença (92). Assim sendo, a anaplasmose é mais comum em animais com idade superior a um ano, considerando também que bovinos em fase avançada de gestação e/ou lactação podem recidivar e desenvolver sinais agudos da doença (91). Os casos hiperagudos são caracterizados por elevada taxa de mortalidade, poucas horas após o aparecimento de sinais clínicos, sendo mais frequente em animais de raça pura e bovinos de elevada produção leiteira (91).

Nos ruminantes, o *A.marginale* apenas se multiplica nos eritrócitos dos bovinos e cada inclusão pode conter entre quatro a oito riquetsias (88). Na fase aguda da infecção cerca de 70% dos eritrócitos podem ficar infetados (88). A resposta imune fagocitária desencadeada pelos eritrócitos infetados resulta em anemia moderada a severa e icterícia, sinais característicos de anaplasmose bovina, sem hemoglobinemia ou hemoglobinúria (88; 91). Os sinais clínicos surgem quando a infecção atinge 1% dos eritrócitos, iniciando-se por piroxia, de 40°C, que acompanha o período de aumento de parasitemia (91). A severidade dos sinais clínicos está associada ao grau de anemia e inclui palidez da pele e mucosas, aumento da frequência cardíaca e respiratória (91). À medida que a parasitemia aumenta os animais ficam fracos, anoréticos, letárgicos e a produção de leite diminui drasticamente em bovinos leiteiros e gestantes, podendo provocar abortos, nos machos surge infertilidade temporária (87; 91). Os sinais clínicos são mais frequentes em bovinos, podendo também surgir noutros ruminantes incluindo o búfalo asiático, bisonte e antílopes africanos (87). Há medida que a infecção evolui, os ruminantes desenvolvem atonia gastrointestinal, com estase ruminal e constipação, ou seja, estes sinais surgem em consequência da desidratação e perda de peso (91). Em alguns animais podem aparecer sintomatologia neurológica, como resultado de anoxia cerebral momentânea (91). Por sua vez, caso o animal sobreviva, entra numa fase de convalescença que dura três a quatro semanas, com icterícia e perda de peso (38; 91).

Em animais adultos ou sob *stress* as taxas de mortalidade variam entre os 50% e 60%, portanto é necessário ter em consideração que os animais apresentam um risco acrescido enquanto estão a ser contidos para tratamento (91). Ocorre também um estado de hiperexcitabilidade no período que antecede a morte, podendo o animal tornar-se agressivo (38). Nos achados de necrópsia podem ser visíveis evidências de anemia severa, icterícia, esplenomegália, hepatomegália, petéquias hemorrágicas na superfície das serosas, especialmente no coração e pericárdio, o coração normalmente encontra-se pálido e flácido (91).

3.6.5. Imunidade

Os animais que recuperam de uma infeção aguda permanecem cronicamente infetados, desenvolvendo regulares mas reduzidos ciclos de bacteriemia, tornando-se imunes e hospedeiros reservatórios para outros animais suscetíveis (87; 92). Cada pico de anaplasmosose é composto por novas variantes antigénicas que são selecionadas através de uma resposta específica do hospedeiro (93). Como referido anteriormente, quando os animais são infetados com menos de seis meses de idade não desenvolvem um quadro clínico da doença, ficando assim imunes (93). Como tal, a recuperação é mais comum em animais jovens (91).

3.7. Métodos de diagnóstico de hemoparasitas em ungulados

A história clínica, sintomatologia e a presença de possíveis vetores permite indicar a suspeita de um determinado hemoparasita, mas para confirmar a sua presença é necessário recorrer a métodos mais específicos e técnicas laboratoriais (68).

Existem vários métodos para o diagnóstico de hemoparasitas, cada um com as suas limitações no que diz respeito à especificidade e sensibilidade do teste, logo, por vezes, um diagnóstico positivo só é garantido após a utilização de vários métodos e/ou xenodiagnósticos (68). Como métodos de diagnóstico pode-se recorrer a: microscopia, por demonstração microscópica da forma parasitária num esfregaço sanguíneo, ou de citologia realizada por biópsia de um nódulo linfático; técnicas de PCR e provas de ADN que podem ser usadas para identificação de espécies parasitárias; provas serológicas como o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA - do inglês *Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*) e o teste da imunofluorescência de anticorpo (IFAT – do inglês *indirect fluorescent antibody test*) que permitem a deteção de anticorpos (68).

3.7.1. Observação microscópica

O exame da gota de sangue fresca ou da *buffy coat* (constituída por células brancas e plaquetas, obtidas através de sangue colhido para tubos de EDTA) em conjunto com informações da situação epidemiológica e conhecimento do tamanho, forma e movimentos típicos do parasita podem permitir a identificação do parasita (55). No entanto, é necessário proceder à fixação e coloração para uma correta identificação do género (55). A observação microscópica de esfregaços sanguíneos ou da *buffy coat* corados consiste num método comum, simples e económico de identificação de hemoparasitas (42; 81). É considerado um método adequado para a deteção de formas parasitárias em infeções agudas devido à elevada especificidade que apresenta na identificação do género do hemoparasita (68; 77).

É necessário ter em conta que os níveis de parasitemia variam ao longo do curso da infeção, encontrando-se elevados na fase inicial da doença, baixos na fase crónica e quase nulos em animais portadores (55). Esta variação do nível de parasitemia resulta numa limitação do método, a baixa sensibilidade, na medida em que os animais portadores podem passar

despercebidos, o que faz com que o método seja desaconselhado quando o nível de parasitemia é muito baixo (68; 77), Outra limitação é a difícil discriminação entre espécies de protozoários dada a sua morfologia semelhante (68; 77). A identificação de parasitas e sua diferenciação pode ser melhorada através do uso de um corante fluorescente como laranja de acridina, em vez da coloração de Giemsa (77).

3.7.1.1. *Trypanosoma sp.*

Através da observação de esfregaços de sangue periférico podem-se observar formas tripomastigotas de *Trypanosoma sp.*. Como ilustra a Figura 12 estes parasitas apresentam núcleo central corado e cinetoplasto, forma curvilínea, com uma extremidade pontiaguda e outra que termina numa membrana ondulante e longo flagelo (42; 58).



Figura 12 - Forma tripomastigota de *T.brucei* identificada num grande cudu (*Tragelaphus strepsiceros*). Ampliação 1000X. (Fonte: Munang'andu, M. H., Siamudaala, V., Munyeme, M., Nambota, A., Mutoloki, S.& Matandiko W. (2010) *Trypanosoma brucei* Infection in Asymptomatic Greater Kudus (*Tragelaphus strepsiceros*) on a Game Ranch in Zambia. The Korean Journal of Parasitology. 48(1): 67-69) (42).

3.7.1.2. *Theileria sp.*

Na fase aguda da infeção por *T.parva* e *T.annulata*, o diagnóstico pode ser feito pela presença de células infetadas com esquizontes ou esquizontes livres em citologias de biópsias de nódulos linfáticos, esfregaços sanguíneos ou cortes histológicos (69). A presença de pequenos piroplasmas nos eritrócitos é sugestiva de infeção, mas o diagnóstico deve ser confirmado pela presença de esquizontes (69). Os piroplasmas podem persistir durante meses a anos em animais recuperados, podendo ser detetados de forma intermitente em diversos exames, como tal, resultados negativos ao exame microscópico não excluem uma infeção latente. Os piroplasmas podem também ser encontrados em citologias *post-mortem* (69).

A análise ao microscópio ótico não permite a distinção entre espécies, no entanto nos eritrócitos as formas de *Theileira* apresentam uma forma arredondada/oval, podendo surgir isoladas ou emparelhadas como que em tétradas, denominada “Cruz de Malta”, Figura 13 (à

esquerda). Os esquizontes (corpos azuis de Koch) são encontrados nos linfócitos, livres no citoplasma, Figura 13 (à direita) (38).

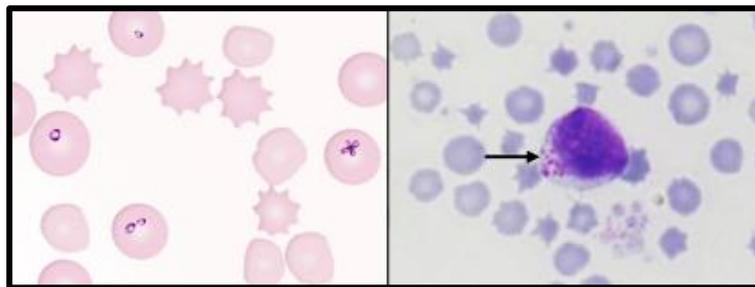


Figura 13 – Representação esquemática de formas eritrocitárias de *Theileria sp.* (à esquerda) e imagem de microscopia ótica de esquizonte (seta) de *Theileria sp.* num linfócito (à direita).
(Adaptado de Guerra, D & Carvalho, L. M. (2012). Hemoparasitoses de Bovinos em Portugal. Albéitar) (38).

Ao nível do microscópio eletrónico, os piroplasmas intraeritrocitários são descritos como pleomórficos, contudo podem apresentar-se redondos, ovais, bipolares ou na forma de bacilo. As cruzes de Malta e formas pares também são comuns (59).

3.7.1.3. *Babesia sp.*

Nos esfregaços sanguíneos são observados os merozoítos de babesias no interior dos eritrócitos, isolados, ou se em pares, apresentam ângulos característicos, com as extremidades opostas (51). Em termos morfológicos, apresentam forma piriforme, redonda ou alongada, incluindo-se nas pequenas ou grandes babésias, como ilustra a Figura 14 e 15, respetivamente (51). Na fase aguda da doença os parasitas são facilmente encontrados nos eritrócitos com uma sensibilidade que permite detetar parasitémias na proporção de um parasita para 10^6 eritrócitos (77).

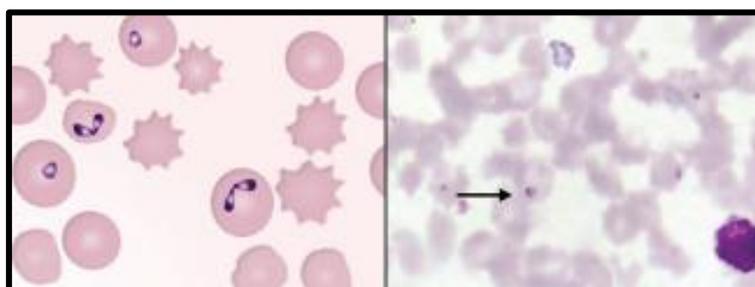


Figura 14- Representação esquemática (à esquerda) e imagem de microscopia ótica (à direita) de eritrócitos infetados com *B. bovis* (pequena babésia). (Adaptado de Guerra, D & Carvalho, L. M. (2012). Hemoparasitoses de Bovinos em Portugal. Albéitar) (38).

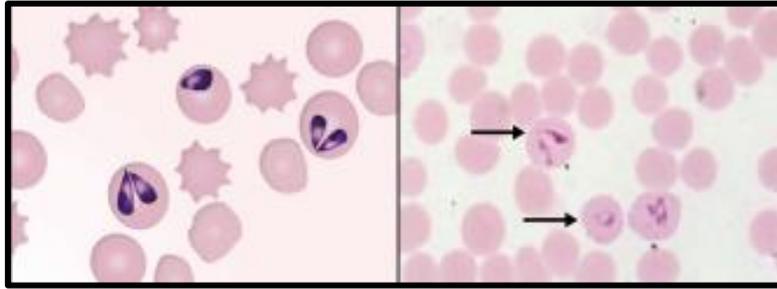


Figura 15- Representação esquemática (à esquerda) e imagem de microscopia ótica (à direita) de eritrócitos infetados com *B. bigemina* (grande babésia). (Adaptado de Guerra, D & Carvalho, L. M. (2012). Hemoparasitoses de Bovinos em Portugal. Albéitar) (38).

3.7.1.4. *Anaplasma sp.*

O exame microscópico de esfregaço sanguíneo é o método de diagnóstico mais utilizado (88). Como ilustra a Figura 16, os corpos de inclusão de *A. marginale*, são estruturas arredondadas, densas e intensamente coradas, localizadas na periferia do eritrócito (38; 88).

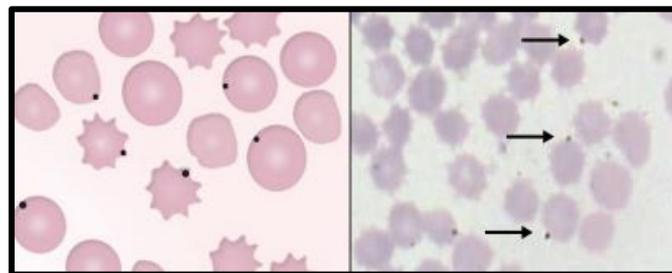


Figura 16 – Representação esquemática de formas eritrocitárias (à esquerda) e imagem de microscopia ótica (à direita) de *Anaplasma marginale* (setas). (Adaptado de Guerra, D & Carvalho, L. M. (2012). Hemoparasitoses de Bovinos em Portugal. Albéitar) (38).

3.7.2. Testes serológicos

A deteção de anticorpos para diagnóstico de hemoparasitoses pode ser feita através do método ELISA, muito utilizado em pesquisas a grande escala, e testes de imunofluorescência de anticorpo (IFAT) (55). Ambos os testes apresentam elevada sensibilidade e especificidade quanto ao género, mas a especificidade relativa à espécie é geralmente baixa (55). Como tal, só podem ser usados como meio de diagnóstico presuntivo (55).

Dentro da serologia, o IFAT continua a ser considerado o *gold standard* dos métodos de diagnóstico recomendado pelo OIE, para a pesquisa dos parasitas economicamente relevantes, principalmente por ser um método rápido, económico, com elevada sensibilidade e que permite analisar um elevado número de amostras (45; 77; 69). É principalmente recomendado quando se pretende analisar animais aparentemente saudáveis ou portadores, pois o título de anticorpos encontra-se significativamente mais elevado nestas fases (68; 77).

Na verdade, os métodos de serologia apresentam algumas limitações, a subjetividade do operador que realiza a interpretação dos resultados, dificuldade de standardização e a não detecção de níveis baixos de anticorpos podem falsear resultados (45; 68; 77). Mas o principal problema deste método está relacionado com as reações cruzadas observadas entre espécies próximas, por exemplo, reações entre antígeno de *T.parva*, *T.annulata* e *T. taurotragi* ou *B. bovis* e *B. bigemina*, não sendo por isso o IFAT utilizado como método de identificação de espécies, devendo nesse caso, optar-se por métodos moleculares (45; 68; 77; 69).

O método ELISA por competição também pode ser utilizado para a pesquisa individual de hemoparasitas (77). O novo teste de ELISA indireto para *T.parva* e *T.mutans*, baseado no antígeno recombinante específico do parasita, tem demonstrado elevada sensibilidade e especificidade (acima de 95%) (69). Por sua vez, o teste ELISA tem a capacidade de detetar anticorpos por um período mais longo que IFAT (69).

3.7.3. Métodos de diagnóstico molecular

Os estudos moleculares revolucionaram os métodos de diagnóstico ao identificar genes específicos, espécies e subespécies, na medida em que permitem a confirmação direta da presença do material genómico do parasita no sangue ou amostras de tecidos (45; 55; 68). Inclui várias técnicas de PCR e electroforese por gel de agarose que possibilitam a detecção e diferenciação de espécies em portadores infetados (68). No entanto, não é plausível a utilização destes métodos quando se pretende uma análise rápida e a grande escala, devendo-se nesse casos optar por métodos serológicos (77). Assim, os ensaios de PCR são úteis para testes confirmatórios ou situações pontuais de testagem, dado que são considerados pelo menos 1000 vezes mais sensíveis que os esfregaços sanguíneos na detecção de hemoparasitas (77).

O ensaio da hibridização por transcriptase reversa baseia-se na amplificação por PCR (reação em cadeia da polimerase) da pequena subunidade ribossomal do gene de ARN do hemoparasita, permite a detecção e identificação dos hemoparasitas em infeções mistas (45). Este método tem a capacidade de incluir múltiplas provas numa mesma sequência e permite que estas sejam processadas simultaneamente num curto espaço de tempo (dez horas), o que atribui a este teste elevada especificidade (94). Falsos negativos podem ocorrer quando os níveis de parasitemia são muito baixos, o que surge frequentemente em infeções crónicas ou quando os *primers* não reconhecem todas as formas isoladas de uma espécie de parasita (55). Por outro lado, quando existem múltiplos parasitas na mesma amostra pode ocorrer competição pelas sondas no PCR por transcriptase reversa, o que resulta na diminuição da sensibilidade do ensaio (45).

Atualmente, o teste molecular mais sensível para a detecção de hemoparasitas é o PCR a tempo real (qPCR), na medida em que este método permite detetar parasitemias, em animais portadores, tão baixas como $8.79 \times 10^{-4} \%$ (45).

Como conclusão, uma baixa hibridização e a ocorrência de reações cruzadas nas sondas podem fazer com que o PCR-RT apresente resultados com menor sensibilidade que qPCR e IFAT (45).

3.7.4. Culturas *in-vitro*

Podem também ser utilizados métodos de cultura *in-vitro* para demonstrar a presença de infecção em animais portadores. A parasitemia detetável através deste método depende da possibilidade de realização e da experiência do operador, sendo que é um método muito sensível para a demonstração de infecção, com 100% de especificidade (77).

O uso de culturas *in-vitro* é feito através do cultivo de formas parasitárias, no entanto não é possível a diferenciação de espécies e nem sempre resultam em sucesso (55).

3.7.5. Xenodiagnósticos

Os xenodiagnósticos permanecem uma ferramenta útil na pesquisa do parasita mas principalmente no sentido epidemiológico, na medida em que pode ser o único meio de confirmar a carraça como vetor e a patologia clínica específica, sendo o primeiro passo no isolamento de um parasita. Mas não é razoável o seu uso como método de análise de rotina e diagnóstico, necessitando também de equipas de pesquisa especializadas (68).

3.8. Tratamento e prevenção de hemoparasitoses em ungulados

O tratamento de um animal com theileriose inclui a ação de agentes quimioterápicos, como as naftoquinonas, como buparvaquona (2,5 mg/Kg, IM) e parvaquona (20 mg/kg, IM) (51; 68; 69). Estes podem ser usados no tratamento de infecções por *T.parva* e *T.annulata* (51; 68; 69). Os fármacos não têm a capacidade de erradicar completamente a infecção, deixam o hospedeiro num estado portador e sem produzir leite durante meses, devido à extensa destruição do sistema imune pela doença (51; 68; 69). A associação destes fármacos a oxitetraciclina (20 mg/Kg, IM) pode ter um efeito potenciador e vantajoso em caso de infecções mistas com *Anaplasma* e *Babesia* (51). Em vitelos está recomendado o tratamento de suporte para anemia (38).

Em termos de vacinação têm sido desenvolvidas vacinas atenuadas para *T.parva* e *T.annulata* (58; 69). Para a *T.annulata* a vacina é preparada por células infetadas com esquizontes que foram isoladas e atenuadas em culturas *in-vitro* (38; 58; 69). Este método de vacinação tem sido realizado em diversos países endémicos, tendo obtido bons resultados (38; 58; 69). A administração subcutânea da vacina deverá ser realizada nos primeiros meses de vida, podendo posteriormente repetir-se a administração, ou em zonas endémicas deixar que o

reforço seja feito por contacto com os vetores (38). No caso da *T.parva* a vacina baseia-se no método de infeção e tratamento, ou seja, é injetada subcutaneamente uma dose de esporozoítos de uma carraça e, simultaneamente, uma formulação de tetraciclinas de longa e curta ação, o que resulta numa ligeira ou inaparente reação de FCL seguida de recuperação (58; 69). Como referido anteriormente os animais recuperados adquirem uma forte imunidade aos seus homólogos, deste modo, no caso das vacinas para *T.annulata*, os animais para além de ficarem imunes ficam portadores de formas parasitárias atenuadas (58; 69). As contingências de produção e distribuição, bem como o receio de transmissão das formas atenuadas a ixodídeos são as principais limitações à comercialização destas vacinas (38). Vacinas recombinantes estão a ser desenvolvidas contendo antígenos dos esporozoítos e esquizontes (58; 69).

Para o tratamento de Babesiose o ideal é optar pelo dipropionato de imidocarb (1,2 mg/kg SC) pois este fármaco tem a capacidade para eliminar completamente os parasitas de animais portadores (38). Uma dose é eficaz no tratamento, enquanto uma dose mais alta de 3 mg/kg promove uma protecção de quatro semanas para *B. bovis* e dois meses para *B. bigemina* (38). Outro fármaco é o aceturado de diminazeno (3,5mg/kg, SC ou IM) que é bem tolerado e tem uma boa margem de segurança, conferindo protecção de duas semanas contra *B.bovis* e quatro semanas contra *B.bigemina*, tendo também demonstrado alguma ação contra os primeiros sintomas de *Theileria sp.*, sendo portanto indicado em infeções mistas de *Anaplasma* e *Babesia* ou quando ocorre uma infeção bacteriana (38; 51).

Os bovinos domésticos desenvolvem imunidade duradora depois de apenas uma infeção com *B.bovis*, *B. divergens* e *B. bigemina*, o que tem sido explorado por alguns países para imunizar os animais (77). A vacinação contra a *Babesia* pode então ser feita com vacinas vivas ou mortas (77). As vacinas vivas contêm espécies de *Babesia* (*B.bovis* e *B.bigemina*) devendo ser usadas com precaução nos animais adultos pelo seu potencial de virulência ou despoletar reações de hipersensibilidade (38; 77). Em relação às vacinas mortas ainda não existe informação suficiente quanto à duração e imunidade conferida (77).

O tratamento de casos de anaplasmose também é feito com dipropionato de imidocarb (3 mg/kg IM), sendo este eficaz, tendo como segunda opção oxitetraciclina (5-10 mg/kg IV, durante 3-5 dias ou dose única de 20 mg/kg IM) (38; 51). A terapêutica não elimina completamente o agente e os animais permanecem portadores (38). A vacinação é feita a partir de *A. m. centrale*, sendo também eficazes contra estirpes menos virulentas de *A. marginale* (38). A protecção desenvolve-se seis a oito semanas e dura vários anos, não devendo ser administrada em adultos devido aos efeitos adversos (38). A vacina pode ser administrada em conjunto com a da babesiose, dispensando em áreas endémicas o reforço vacinal (38; 77). Foram ainda desenvolvidas vacinas mortas e vivas a partir de *A. marginale*, no entanto proporcionam uma imunidade curta e riscos de disseminação do agente não conferem segurança à sua utilização (38).

Em termos médicos, na prevenção de tripanossomoses, podem ser utilizados fármacos como cloreto de isometamídio (0,51 mg/kg), sulfato de quinapiramina, durante a mudança de pastagens ou em picos de parasitemia sazonal (55; 62). Quanto a tratamento pode-se optar por aceturato de diminazeno (3,5-7 mg/kg, SC IM), e cloreto de isometamídio (0,25-1mg/kg, IM profunda, dose terapêutica) metilsulfato de quinapiramina (5mg/kg, SC), tendo sempre em conta que os organismos podem criar resistências aos fármacos e que as dosagens dependem da espécie parasitária (55; 62). Não existem vacinas disponíveis principalmente pela capacidade dos tripanosomas rapidamente modificarem a sua glicoproteína de superfície, para evitar uma resposta imunitária eficaz. Esta variação antigénica também predispõe a um estado de parasitémias intermitentes (55).

O controlo e erradicação da mosca de tsé-tsé como vetor consistem na utilização de inseticidas, nomeadamente piretroides sintéticos aplicados diretamente no animal por *spray* ou *spot on* (55). Outro método de controlo envolve a esterilização de machos de *Glossina*, uma vez que as fêmeas apenas acasalam uma vez na vida, mas esta produção tornar-se-ia dispendiosa e apenas justifica a sua utilização no final de uma campanha de erradicação, quando a densidade remanescente de moscas fosse muito reduzida (55). Como tal, o método mais aceite e utilizado pelas populações locais no controlo do vetor é a utilização de feromonas em tiras de fita-cola como isco, método simples, barato e não poluente (55).

O controlo de artrópodes e os agentes patogénicos por estes transmitidos em zonas endémicas tem, ao longo dos anos, incluído o tratamento com desparasitantes/acaricidas nos hospedeiros mamíferos de forma a prevenir a infeção. Para além de este ser um procedimento com elevados custos e trabalho laboratorial, este procedimento apenas se tem mostrado eficaz se administrado de forma adequada e contínua (58). As perdas causadas por ixodídeos e o crescente aparecimento de resistências aos fármacos têm motivado os cientistas na pesquisa de métodos alternativos de controlo destes artrópodes (69; 84). Como métodos alternativos mais sustentáveis e fiáveis surge a combinação de estratégias de controlo de vetores, vacinação e utilização de raças resistentes (69; 84). A introdução de raças cruzadas selecionadas de animais tolerantes a determinado hemoparasita, como por exemplo a raça *Shorthorn* do Este de África que adquiriu resistência inata ao *Trypanosoma*, é considerada uma alternativa viável aos métodos de controlo químicos (55; 84). Outro exemplo é a resistência dos zebus aos ixodídeos e babesiose, que motiva a substituição da raça pura de *Bos taurus* por *Bos indicus* (84). No entanto, estas raças ainda não foram totalmente aceites por serem de menor porte e inferior taxa de produção leiteira (55).

Por outro lado, em áreas que não é possível a eliminação do vetor, as carraças são controladas por repelentes e acaricidas e deve-se apostar na redução da exposição dos animais domésticos ao vetor (77). Os ambientes endémicos devem ser cuidadosamente monitorizados aquando da introdução de novos animais não imunizados, controlando também a introdução de novas espécies do agente infeccioso e interrupções na exposição às carraças e

à doença por alterações climáticas ou fatores relacionados com o hospedeiro e manejo (40; 77).

Em casos de surtos de doença, os animais afetados devem ser tratados e os restantes sujeitos a tratamento preventivo. Idealmente todos os animais deveriam ser testados posteriormente para a presença de infeção (38).

A aplicação destas medidas a nível global implica que estes produtos se tornem economicamente viáveis, acessíveis, eficazes e seguros (58). Adicionalmente é necessária uma melhor compreensão da estabilidade endémica do parasita e da importância de hospedeiros portadores no controlo das infeções (58). Atualmente, a melhor abordagem passa pelo tratamento intermitente com acaricidas, minimizando os danos diretos das carraças, seleção de raças de hospedeiros naturais e imunização dos animais suscetíveis, com o intuito de preservar a estabilidade enzoótica (58). O uso de antigénios presentes na saliva e parte anterior do intestino das carraças têm sido usados para imunizar os mamíferos, assim como a administração oral de fármacos de longa ação que impedem que a ligação da carraça ao hospedeiro, proporcionando uma proteção a longo termo (58). Este tipo de proteção é recomendado em locais onde não é possível eliminar a 100% a presença das carraças (58).

4. Pesquisa de hemoparasitas em ungulados do Badoca Safari Park

4.1. Materiais e métodos

O parque localizado na Vila Nova de Santo André, distrito de Setúbal, tem uma área total de 90 hectares e encontra-se a uma altitude inferior a 100m. Segundo a classificação de Koppen esta região é classificada como clima temperado com Inverno chuvoso e Verão seco e pouco quente (Csb) (95). Através de dados registados no Instituto Português do Mar e Atmosfera as normais climatológicas provisórias (1981-2010) para o distrito de Setúbal, referem que as temperaturas em meses frios, de dezembro a fevereiro, variaram em média entre mínimas de 4,8° a 6,6° e máximas de 15,3° a 16,7° (95). Nos meses quentes, de junho a agosto, variaram em média entre mínimas de 14,3° a 16,3° e máximas de 27,4° a 30,1°. A precipitação acumulada anual varia entre os 600 e 800mm (95).

Para a pesquisa de hemoparasitas em ungulados no Badoca Safari Park, foram colhidas amostras de sangue de um total de 60 animais, em que 38 são animais selvagens em cativeiro, em regime extensivo, numa área de 40 hectares denominada de safari. Os restantes 22 animais encontram-se noutra área do parque, a quintinha, e são animais domésticos.

Nos ungulados domésticos, as amostras de sangue foram colhidas de cinco asinos (*Equus asinus*), uma ovelha anã (*Ovis aries*), treze cabras anãs (*Capra aegragus hircus*) e três cabras italianas (*Capra girgentana*). A aproximação necessária para a realização de uma colheita de sangue nos animais selvagens em segurança é geralmente impossível, assim, as colheitas de sangue efetuadas foram limitadas pela existência de casos de imobilização química (Figura 17). Deste modo, colheram-se amostras de sangue a dois veados (*Cervus elaphus*) e uma carraça que se encontrava no macho, um búfalo do Congo (*Syncerus caffer nanus*), seis cobos de leite (*Kobus leche*), sete chitais (*Axis axis*), catorze muflões (*Ammotragus lervia*), dois elandes (*Taurotragus oryx*) e cinco búfalos áfro-asiáticos. Como os dois elandes e os búfalos áfro-asiáticos estavam habituados a alguma manipulação não foi necessário recorrer à sedação para a realização dos esfregaços. Todos os animais à exceção do búfalo do Congo se encontravam aparentemente saudáveis.



Figura 17 – Maneio médico durante a imobilização química de dois chitais (*Axis axis*).

As colheitas foram realizadas em animais adultos e sub-adultos, tanto em machos como em fêmeas. Os animais foram identificados com um marcador e registadas as suas características (espécie, macho/fêmea, adulto/sub-adulto).

Foram utilizados dois métodos de colheita de sangue a campo. Um primeiro método consistia na colheita de sangue da veia jugular para um tubo de 5ml com anticoagulante, EDTA, e posterior realização do esfregaço sanguíneo na clínica. O outro método envolvia a punção da extremidade de uma orelha, para colheita de uma gota de sangue periférico, sendo o esfregaço realizado no campo e no momento, como demonstra a Figura 18. Possivelmente o método de colheita terá reflexos na qualidade dos esfregaços e na veracidade dos resultados, na medida em que a colheita de sangue a partir de um vaso central, como a veia jugular, diminui a probabilidade de se encontrar hemoparasitas, ou de a carga parasitária não ser real. Portanto o ideal é a realização do esfregaço sanguíneo através da primeira gota de sangue periférico.



Figura 18 – Realização de esfregaço sanguíneo no campo, após colheita de sangue periférico de um elande (*Taurotragus oryx*).

A realização do esfregaço, como ilustra a Figura 18, consiste em três passos. Primeiramente é colocada uma gota de sangue na extremidade de uma lâmina limpa e desengordurada, depois, uma segunda lâmina apoiada num ângulo de 45° em relação à outra. De seguida, desliza-se a segunda lâmina até à gota de sangue, para que este se espalhe ao longo da extremidade por capilaridade. O terceiro passo consiste num movimento firme, contínuo e delicado até à outra extremidade da lâmina, obtendo-se assim o esfregaço sanguíneo (96).

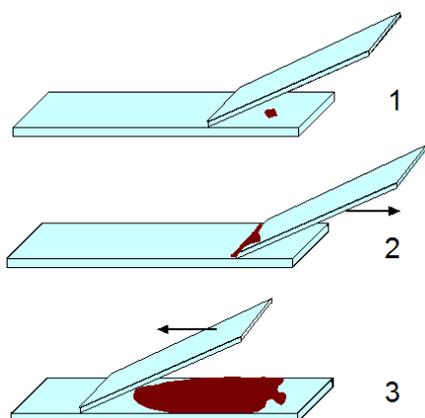


Figura 19 - Ilustração da técnica para realização de esfregaço sanguíneo (Adaptado de <http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/studies/sds-page/bloodcytology.html>, Junho 2016) (96).

Um esfregaço de qualidade é essencial para uma correta observação, influenciando também a eficácia da coloração. Como tal, idealmente o esfregaço deve consistir numa camada de sangue fina sem falhas ou quebras, no qual devem ser identificáveis três zonas: a base, que é a zona próxima ao local de deposição da gota, o corpo e a cauda onde é visível a monocamada (97). A observação rigorosa do esfregaço sanguíneo deve ser feita na zona da

monocamada, já que esta é a área ideal para a avaliação das células, porque para além de secar rapidamente as células estão dispersas numa única camada, com o mínimo de sobreposições e ruturas celulares (97).

Sempre que possível foram realizados dois esfregaços sanguíneos por animal e a secagem foi feita por agitação manual. De seguida os esfregaços foram acondicionados em caixas apropriadas para transporte.

Numa outra fase, os esfregaços sanguíneos foram corados com a coloração Giemsa e observados no Laboratório de Parasitologia Victor Caeiro do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade de Évora. A técnica de coloração Giemsa utilizada encontra-se descrita e ilustrada no Anexo I.

A observação dos esfregaços sanguíneos deve ser feita de forma sistemática para que o método de análise seja o mesmo para todas as amostras. As observações dos esfregaços foram realizadas num microscópio Olympus CX41, na objetiva de 100X com óleo de imersão e foram observados em média vinte campos da na zona da monocamada, para a pesquisa dos hemoparasitas.

4.2. Resultados

Neste estudo considera-se um resultado positivo quando à observação de esfregaços sanguíneos de ungulados foram encontradas formas morfológicamente semelhantes a protozoários de *Babesia*, *Theileria*, *Trypanosoma* ou *Anaplasma*.

Como demonstra a Tabela 22, dos 59 esfregaços sanguíneos realizados a ungulados do parque, foram obtidos 13 resultados positivos para formas de *Theileria sp.* e 23 para *Anaplasma sp.*, sendo que em nove animais foram identificadas simultaneamente formas de *Theileria* e *Anaplasma*. Em nenhum dos esfregaços analisados foram observadas formas semelhantes a *Babesia sp.* ou *Trypanosoma sp.*. As informações completas dos resultados obtidos e características dos ungulados analisados encontram-se nas tabelas do anexo II e III.

Segundo a Tabela 22, foram encontradas formas semelhantes a *Theileiria* nos dois veados ibéricos (*Cervus elaphus*), no búfalo do Congo (*Syncerus caffer nanus*), cinco muflões (*Ammotragus lervia*), três cobos de leite (*Kobus leche*), um búfalo Afro-Asiático, uma cabra anã (*Capra aegragus hircus*), não tendo sido observadas em chitais (*Axis axis*), elandes (*Taurotragus oryx*), asininos (*Equus asinus*), ovinos (*Ovies aries*) e cabras girgentanas (*Capra girgentana*). Assim, foram identificadas formas de *Theileria* em 22,03% dos animais observados. Na Figura 20 é possível observar, como indica a seta formas intraeritrocitária sugestiva de *Theileria*.

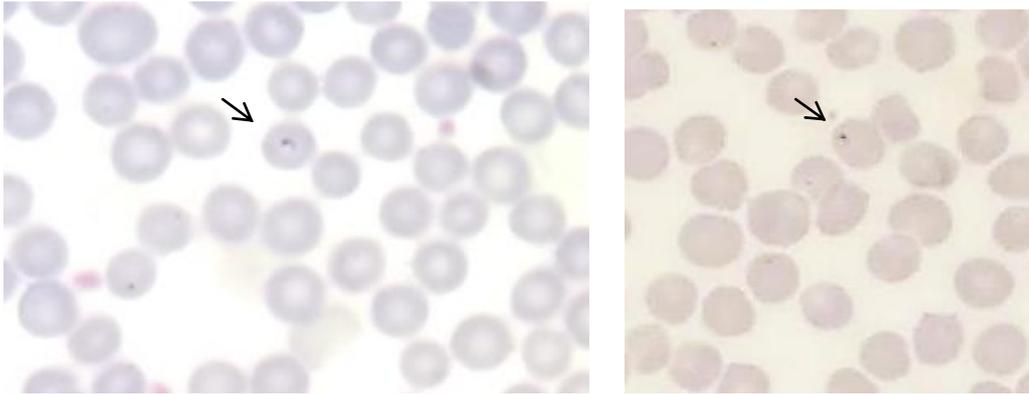


Figura 20 – Formas de *Theileria* (seta) na ampliação X1000. À esquerda num cobo de leche (*Kobus leche*), à direita num búfalo Áfro-Asiático.

Em relação à Riquétisia *Anaplasma*, foram encontradas formas sugestivas do parasita nos dois veados ibéricos (*Cervus elaphus*), um búfalo do Congo (*Syncerus caffer nanus*), quatro muflões (*Ammotragus lervia*), dois cobos de leche (*Kobus leche*), um asinino (*Equus asinus*), cinco cabras anãs (*Capra aegragus hircus*), um ovino (*Ovies aries*) e três cabras girgentanas (*Capra girgentana*). Não tendo sido identificadas formas compatíveis em búfalos Áfro-Asiáticos e elandes (*Taurotragus oryx*). Portanto foram identificadas formas *Anaplasma* em 38,98% dos animais observados.

Na Figura 21 é possível observar, como indica a seta uma estrutura intraeritrocitária arredondada, densa e intensamente corada, localizadas na periferia, sugestiva de *Anaplasma*.

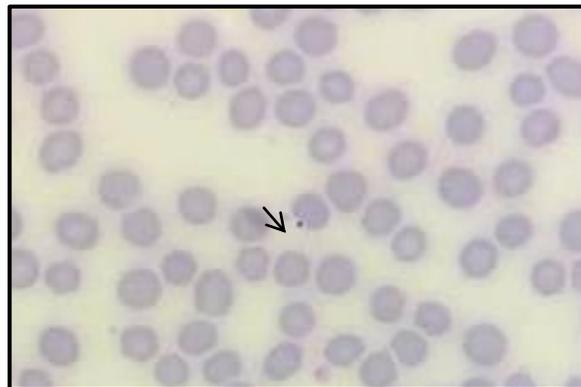


Figura 21- Formas de *Anaplasma* (seta) na ampliação X1000 num veado ibérico (*Cervus elaphus*).

Em alguns animais foram encontradas simultaneamente formas de *Theileria* e *Anaplasma*, nomeadamente, nos dois veados ibéricos (*Cervus elaphus*), o búfalo do Congo (*Syncerus caffer nanus*), quatro muflões (*Ammotragus lervia*), um cobo de leche (*Kobus leche*) e uma cabra anã (*Capra aegragus hircus*), o que correspondeu a 15,25% dos animais observados.

Tabela 22 – Formas identificadas de *Theileria* e *Anaplasma* nos esfregaços de sangue observados de ungulados selvagens e domésticos. n=27, em que n corresponde ao número total de formas parasitárias encontradas.

		Número de animais observados	Esfregaço		Formas encontradas					
			SP	EDTA	<i>Theileria</i>	<i>Anaplasma</i>	<i>Theileria + Anaplasma</i>	Fi	Fr	
Ungulados	Selvagens	<i>Cervus elaphus</i>	2	2	-	2	2	2	2	100,00%
		<i>Syncerus caffer nanus</i>	1	-	1	1	1	1	1	100,00%
		<i>Axis axis</i>	7	2	5	-	4	-	4	57,14%
		<i>Ammotragus lervia</i>	14	3	11	5	4	4	5	35,71%
		<i>Kobus leche</i>	6	6	-	3	2	1	4	66,67%
		Búfalo Afro-Asiático	5	5	-	1	-	-	1	20,00%
	<i>Taurotragus oryx</i>	2	2	-	-	-	-	-	0,00%	
	Domésticos	<i>Equus asinus</i>	5	5	-	-	1	-	1	20,00%
		<i>Capra aegragus hircus</i>	13	13	-	1	5	1	5	38,46%
		<i>Ovies aries</i>	1	1	-	-	1	-	1	100,00%
		<i>Capra girgentana</i>	3	3	-	-	3	-	3	100,00%
	Fi		59	42	17	13	23	9	27	45,76%
Fr		100,00%	71,19%	28,81%	22,03%	38,98%	15,25%	45,76%		

As Tabelas 23 e 24 correspondem a sínteses das Tabelas de registo em anexo II e III, permitindo assim observar os dados completos dos ungulados domésticos e selvagens, respetivamente, nos quais foram encontradas formas parasitárias. A Tabela 23 permite verificar que nos ungulados domésticos as formas parasitárias foram encontradas maioritariamente em animais adultos (A - 70%), com apenas três registos em animais sub-adultos (SA - 30%). Nos ungulados selvagens, Tabela 24, a situação inverte-se, já que a faixa etária onde foram observadas mais formas parasitárias foi nos animais sub-adultos com dez registos (SA - 59%) em comparação aos animais adultos com sete (A - 41%). No entanto, nos ungulados selvagens os animais sub-adultos fizeram parte de 51% da amostra, enquanto que nos ungulados domésticos apenas correspondiam a 23% dos animais.

Tabela 23 – Registo de dados dos ungulados domésticos em que foram observadas formas parasitárias e resultados obtidos.

Ungulados domésticos						
Espécie	Nome comum	Sexo	Idade	Colheita	<i>Theileria</i>	<i>Anaplasma</i>
<i>Equus asinus</i>	Burro	F	A	SP	-	+
<i>Capra aegragus hircus</i>	Cabra anã	M	SA	SP	-	+
		F	A	SP	-	+
		F	SA	SP	+	+
		F	A	SP	-	+
		F	A	SP	-	+
<i>Ovis aries</i>	Ovelha anã	F	SA	SP	-	+
<i>Capra girgentana</i>	Cabra girgentana	M	A	SP	-	+
		F	A	SP	-	+
		F	A	SP	-	+

Legenda: (F) feminino; (M) masculino; (A) adulto; (SA) subadulto, SP sangue periférico; (+) resultado positivo, (-) resultado negativo.

Tabela 24- Registo de dados dos ungulados selvagens em que foram observadas formas parasitárias e resultados obtidos.

Ungulados Selvagens						
Espécie	Nome comum	Sexo	Idade	Colheita	<i>Theileria</i>	<i>Anaplasma</i>
<i>Cervus elaphus</i>	Veado Ibérico	M	SA	SP	+	+
		F	SA	SP	+	+
<i>Syncerus caffer nanus</i>	Búfalo do Congo	F	A	EDTA	+	+
<i>Axis axis</i>	Chital	F	SA	EDTA	-	+
		F	A	EDTA	-	+
		F	SA	EDTA	-	+
		F	A	SP	-	+
<i>Ammotragus lervia</i>	Muflão	M	SA	EDTA	+	+
		M	SA	EDTA	+	+
		F	A	EDTA	+	+
		F	SA	EDTA	+	+
		M	SA	SP	+	-
<i>Kobus leche</i>	Cobo de leite	F	SA	SP	+	-
		M	A	SP	-	+
		M	SA	SP	+	-
		F	A	SP	+	+
Búfalo afro-asiático		M	A	SP	+	-

Legenda: (F) feminino; (M) masculino; (A) adulto; (SA) sub-adulto, (SP) sangue periférico; (EDTA) sangue central colhido para tubo de EDTA (+) resultado positivo, (-) resultado negativo.

Na Tabela 25, é possível verificar que o protozoário do género *Theileria* foi identificado em 26,09% dos machos observados e 19,44% das fêmeas, enquanto que *Anaplasma* foi em 26,09% dos machos e 47,22% das fêmeas.

Tabela 25 – Frequências absolutas (Fi) e relativas (Fr) da presença de formas de *Theileria* e *Babesia* de acordo com o género. n=59, em que n corresponde ao número total de animais observados.

	Nº de animais observados	Fi (<i>Theileria</i>)	Fr (<i>Theileria</i>)	Fi (<i>Anaplasma</i>)	Fr (<i>Anaplasma</i>)
Machos	23	6	26,09%	6	26,09%
Fêmeas	36	7	19,44%	17	47,22%
Total	59	13	22,03%	23	38,98%

Foram assim encontradas formas parasitárias em 17 ungulados selvagens, aproximadamente 46% da população selvagem observada. Nos ungulados domésticos foram

positivos 10 animais, o equivalente a 45,45% da população em questão. No entanto, apesar de terem sido encontradas formas em diversos animais, a quantidade não foi significativa, sendo classificada de uma forma geral como rara ou raríssima.

4.3. Discussão

O aumento da transmissão de hemoparasitas por vetores entre espécies selvagens e domésticas pode ser motivado por três fatores (44). Em primeiro lugar, o aumento da incidência pode justificar-se por um maior contacto direto ou indireto entre as espécies sobre influência humana, que associado, por exemplo, à translocação de animais, pode facilitar a exposição e partilha de agentes patogénicos (40; 44). Por outro lado, muitos dos vetores possuem uma vasta gama de hospedeiros e necessitam de realizar várias refeições para completar o seu ciclo de vida (39). Como exemplo, surgem os ixodídeos do género *Rhipicephalus sp.*, que necessitam de três hospedeiros para completar o seu ciclo, podendo, assim, contribuir para o interface entre espécies (39; 44). Por último, hospedeiros que sejam filogeneticamente próximos estão mais propícios a partilhar agentes patogénicos do que outros mais distantes, devido às semelhanças fisiológicas e ecológicas que possam existir entre espécies (44).

Neste estudo de pesquisa de hemoparasitas, em ungulados selvagens e domésticos do Badoca Safari Park, foram observadas formas morfológicamente semelhantes a parasitas em 45,76% dos esfregaços sanguíneos realizados. De facto, aproximadamente 63% dos resultados positivos foram registados em ungulados selvagens. No entanto, dado que a amostra de animais selvagens (37 animais) foi superior à de ungulados domésticos (22 animais), é necessário fazer a análise dos resultados em proporção dos animais observados. Assim sendo, foram identificadas formas parasitárias em 17 esfregaços sanguíneos de ungulados selvagens, o que corresponde a 46% da população selvagem estudada. Por sua vez, nos ungulados domésticos foram 10 os resultados positivos, equivalendo a 45,45% da amostra. Logo, com base nos resultados obtidos é possível verificar que, aparentemente, não existe evidência da existência de preferência de infeção em animais selvagens ou domésticos.

As formas parasitárias observadas são compatíveis com hemoparasitas do género *Theileria* e *Anaplasma*, não tendo sido identificadas formas semelhantes a *Babesia* ou *Trypanosoma* nos ungulados estudados. De tal forma que, 22,03% da amostra apresentava formas de *Theileria*, 38,98% de *Anaplasma* e em 15,25% foram identificadas estruturas típicas dos dois géneros de hemoparasitas. No entanto, a quantidade encontrada em cada esfregaço observado foi considerada rara ou raríssima.

Na verdade, dos treze animais em que foram encontradas formas semelhantes a *Theileria*, apenas um caso pertenceu a um ungulado doméstico, uma cabra anã (*Capra aegragus hircus*). Enquanto nos animais selvagens foram observadas formas semelhantes a *Theileria* em veados ibéricos (*Cervus elaphus*), no búfalo do Congo (*Syncerus caffer nanus*),

muflões (*Ammotragus lervia*), cobos de leche (*Kobus leche*), no búfalo afro-asiático, sendo que, este último é considerado o hospedeiro natural de algumas espécies de *Theileria*, nomeadamente *T.parva* (58).

As formas morfológicas de *Anaplasma* foram observadas em dez ungulados domésticos, nomeadamente um burro (*Equus asinus*), cabras anãs (*Capra aegragus hircus*), um ovino (*Ovis aries*) e cabras gargentanas (*Capra gargentana*). O número de animais selvagens também foi semelhante, doze, incluindo veados ibéricos (*Cervus elaphus*), um búfalo do Congo (*Syncerus caffer nanus*), muflões (*Ammotragus lervia*) e cobos de leche (*Kobus leche*).

Todos os animais abordados neste estudo, com exceção do búfalo do Congo (*Syncerus caffer nanus*), encontravam-se aparentemente saudáveis. Situação que, entra em concordância com estudos anteriores que demonstram que a deteção de hemoparasitas em animais selvagens é muitas vezes acidental e que estes são imunes à infeção (84). Os resultados são também coincidentes na necessidade de Portugal ser classificado como uma zona endémica para hemoparasitoses bovinas pela ausência de alterações no estado geral de animais domésticos possivelmente portadores (38).

A possível forma de infeção destes animais é desconhecida, na medida em que podem ter adquirido a infeção no parque ou serem já portadores da mesma aquando da entrada na coleção zoológica. Porém, os animais subadultos deste estudo com resultados positivos já nasceram no parque, o que implica que estes tenham adquirido os hemoparasitas no local. O facto de grande parte da colheita de sangue dos ungulados selvagens ter sido realizada em animais que foram translocados para outro local, sugere que este procedimento pode servir como mecanismo de dispersão dos hemoparasitas (42).

No entanto, é essencial ter em conta que esta quantidade pode mesmo assim estar subvalorizada pelo método em utilizado. Os esfregaços sanguíneos não permitem detetar uma prévia exposição a níveis baixos de infeção podendo facilmente passar despercebidos (84). Também não foram encontrados animais com sinais clínicos aquando da colheita, no entanto também não foram realizadas análises ao sangue para verificar alguma alteração nesses parâmetros (84). De facto, o tamanho da amostra e o número de animais em que foram encontradas as formas morfológicamente semelhantes a parasitas eritrocitários não permitiam que fosse realizada uma análise do impacto dos hemoparasitas nos parâmetros sanguíneos (84).

Outro resultado interessante de se analisar é, por um lado a qualidade do esfregaço obtido por sangue armazenado em tubos de EDTA em comparação com o sangue periférico realizado a campo e no momento. A Figura 22 corresponde a esfregaços de sangue de dois muflões (*Ammotragus lervia*), porém na Figura 22 (da esquerda) o sangue foi colhido da veia jugular e armazenado num tubo de EDTA, enquanto que, na Fig. 22 (da direita) o esfregaço foi realizado diretamente de sangue periférico. Em ambos os casos foi selecionado um campo

com boa qualidade para análise e é possível verificar que no esfregaço de sangue periférico a coloração aderiu melhor proporcionando um campo mais limpo e com menos artefactos.

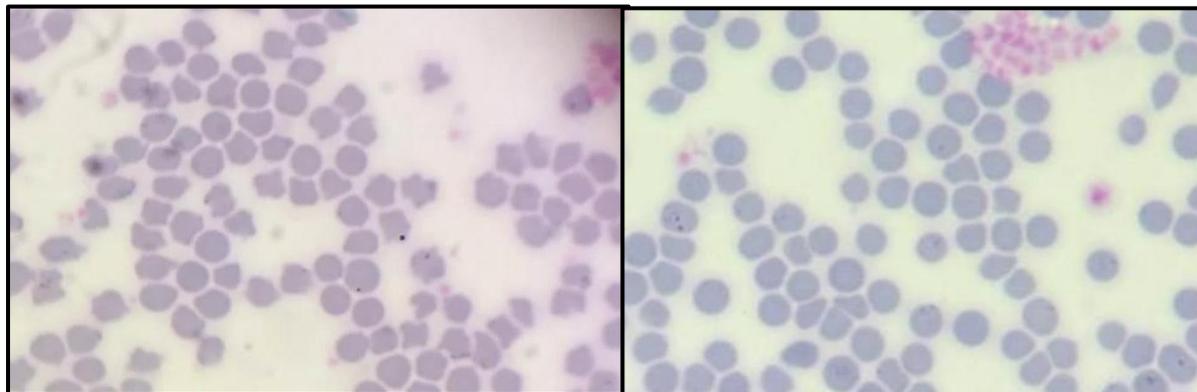


Figura 22 – Esfregaços sanguíneos de muflões (*Ammotragus lervia*) na ampliação X1000. À esquerda depois de conservado em tubo com EDTA, à direita realizado diretamente de sangue periférico.

A análise dos esfregaços também pode ser prejudicada por um esfregaço sanguíneo de fraca qualidade ou uma incorreta coloração que resulta no aparecimento de artefactos que podem invalidar uma observação (98). Alterações da coloração e aparecimento de artefactos também podem ser induzidos pelo uso de anticoagulantes, pois segundo Narasimha et al., 2008, as alterações pelo uso de EDTA surgem após duas horas de armazenamento (98). De facto, num número relevante de amostras em ungulados selvagens, principalmente chitais (*Axis axis*) e muflões (*Ammotragus lervia*) a colheita foi realizada de um vaso central e armazenada em tubos de EDTA. Algo que implica uma menor probabilidade de encontrar formas parasitárias ou a carga parasitária pode não ser real, podemos concluir que a quantidade de formas parasitárias de *Theileria* e *Anaplasma* encontradas nesses animais podem estar subvalorizadas.

Como qualquer método de diagnóstico de hemoparasitas descrito ao longo do trabalho, a pesquisa através de esfregaços sanguíneos apresenta as suas limitações, como o processo de preparação em si (método de colheita, qualidade do esfregaço, coloração adequada) e a flutuação do nível de parasitémia durante uma infeção, encontrando-se alta na fase aguda, reduzida na fase crónica e quase nula em animais portadores (55). Outra limitação é a difícil discriminação entre espécies de protozoários dada a sua morfologia semelhante e subjetividade do operador (68; 77).

Em suma, o objetivo deste estudo cingia-se à pesquisa de formas morfológicamente compatíveis com formas parasitárias em ungulados do parque, onde foram obtidos resultados positivos para *Theileria* e *Anaplasma*. O estudo em questão poderia prosseguir se fosse realizada pesquisa de vetores, ou se avançassem para métodos diagnóstico com maior sensibilidade e especificidade, tal como ensaios de biologia molecular, para confirmar os resultados obtidos e determinar se os animais já contataram com o parasita. Sendo que, neste último caso também se poderia recorrer à avaliação da soroprevalência através de métodos serológicos como ELISA e IFAT (84). Assim, os resultados obtidos no presente estudo são particularmente importantes para apelar a atenção para este tema, promovendo o estabelecimento de estratégias efetivas no controlo de hemoparasitoses e prevenção da transmissão de infeções dos animais selvagens para espécies domésticas e humanos (42).

5. Considerações finais

Nas últimas décadas, tem surgido um interesse crescente sobre as doenças transmitidas por vetores, não só na área da medicina veterinária e humana como a nível sócio-económico, assim como um problema de saúde pública agrupado no conceito *One Health* (39; 48). No entanto, a prevalência a nível mundial ainda continua a aumentar associada também a um contacto mais próximo entre animais selvagens e domésticos, o que implica melhorias no que diz respeito à abordagem de diagnóstico, tratamento e medidas preventivas (43; 48). O controlo de ixodídeos e dos hemoparasitas por estes transmitidos são considerados dos principais problemas sanitários e de manejo em África, ao mesmo nível que as tripanosomoses transmitidas pela mosca *Glossina* (39). De facto, os ixodídeos, para além de atuarem como vetores de protozoários, bactérias, vírus e fungos, também causam impacto direto no hospedeiro pelo seu comportamento alimentar, provocando lesões na pele e tecido subcutâneo com perda de sangue associada (48). Por outro lado, existe uma grande flutuação da carga dos vetores de acordo com as variações climáticas, hospedeiros vertebrados e até mesmo das espécies de ixodídeo em questão.

Atualmente, a vacinação com vacinas vivas atenuadas contra a theileriose tropical e babesiose, ainda que existam desvantagens associadas, constitui um método eficaz de imunização. Apesar dos avanços tecnológicos na transformação dos parasitas, bloqueio de genes e sequenciação genómica, as vacinas mortas ainda não são efetivas (40). Existe por isso, uma contínua necessidade de utilizar vacinas vivas no controlo de ixodídeos e parasitas por estes transmitidos em vários locais do mundo (40). Outro ramo importante de pesquisa para a prevenção e controlo de hemoparasitoses é a possibilidade de criação de vacinas conjuntas contra hemoparasitas e os respetivos hospedeiros invertebrados, que em sinergia obtenham resultados mais favoráveis do que a aplicação individual para cada grupo (38).

Como Portugal é considerado uma zona endémica de algumas espécies de hemoparasitas, o aparecimento de sinais clínicos por norma não é tão frequente, pelo menos em raças autóctones, mas suspeita-se que a percentagem de animais portadores seja elevada (38). Portanto, o principal investimento deve ser feito no controlo de hemoparasitas e vetores e não propriamente na sua erradicação (38). A entrada de animais exóticos e saída de autóctones provoca desequilíbrios na relação entre o parasita e hospedeiro que poderão despoletar surtos de doença, principalmente por, neste caso, se tratarem de animais selvagens provenientes de outros parques e/ou países. Esta quebra para além de implicações a nível económico e comercial pode também ter impacto na saúde pública, dado que algumas das doenças em questão são zoonoses (38). Assim, a importação de animais para zonas endémicas deve ser acompanhada de vacinação e os animais devem ser introduzidos primeiramente numa pastagem em períodos de menor atividade dos vetores e em idades menos suscetíveis à infeção (38).

6. Bibliografia

1. Badoca Safari Park (2016). http://badoca.pt/?page_id=131. Acedido em maio de 2016.
2. Fowler, M. E.(2011). *in: Restraint and handling of wild and domestic animals*. 3rd edition. John Wiley & Sons. EUA. ISBN 1119949378, 9781119949374. pp. 12,13,69.
3. Laule, G. E.(2003). Positive reinforcement training and environmental enrichment: enhancing animal well-being. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. **223**: 969-973.
4. Miller, R. E., & Fowler, M. E.(2014). *in: Fowler's zoo and wild animal medicine*. Elsevier Health Sciences, Missouri, ISBN 978-1-4557-7397-8, pp. 475,477,618,620-626,643.
5. Morris, C.(2016). 2015 Corbin Award Winner: Behavior and training of companion and zoo animals. *2016 Joint Annual Meeting. Asas*.
6. Claxton, A. M (2011). The potential of the human–animal relationship as an environmental enrichment for the welfare of zoo-housed animals. *Applied Animal Behaviour Science*. **133**: 1-10.
7. Swaisgood, R. R., & Shepherdson, D. J.(2005). Scientific approaches to enrichment and stereotypies in zoo animals: what's been done and where should we go next? *Zoo Biology*. **24**: 499-518.
8. Shepherdson, D. and Asa, C.S.& Porton, I.J. (2010). Principles of and Research on Environmental;Contraception as a management tool for controlling surplus animals. *in: Wild mammals in captivity: principles and techniques for zoo management*. 2nd edition : University of Chicago Press. Chicago .ISBN 0226440117. 9780226440118. pp. 62-66;469-482.
9. Newberry, R. C.(1995). Environmental enrichment: increasing the biological relevance of captive environments. *Applied Animal Behaviour Science*. **44**: 229-243.
10. van Asten, A. J., Nikolaou, G. N., & Gröne, A.(2010). The occurrence of cpb2-toxigenic *Clostridium perfringens* and the possible role of the β 2-toxin in enteric disease of domestic animals, wild animals and humans. *The Veterinary Journal*. **183**: 135-140.
11. Porton, I. J.(2005). The Ethics of wildlife contraception. *in: Wildlife Contraception: Issues, Methods, and Applications*. 1st edition. JHU Press. Baltimore. EUA. ISBN 0801883040, 9780801883040.
12. Contrato, 3 de Março de 1973, Text of the Convention, Convenção de Washington (CITES), Signed at Washington, D.C.
13. Griffin, A. S., Blumstein, D. T., & Evans, C. S.(2000). Training captive-bred or translocated animals to avoid predators. *Conservation biology*. **14**: 1317-1326.

14. Melfi, V.(2013). Is training zoo animals enriching? *Applied Animal Behaviour Science*. **147**: 299-305.
15. Dorrestein, G.M., Redig, P.T. & Ackermann, J.(2009). Nursing the sick bird; Raptors. *in: Handbook of Avian Medicine*. 2nd edition. Elsevier/Saunders. London. ISBN 0 7506 3598 3. pp.90,196-197.
16. Tully Jr., T.N. (2008). Birds. *in: Manual of Exotic Pet Practice*. 1st edition. Elsevier Health Sciences. St. Louis. Missouri. ISBN: 978-1-4160-0119-5. pp 271:273.
17. Doneley, B.(2010). Clinical Techniques. *in: Avian medicine and surgery in practice: companion and aviary birds*. Manson Publishing. London. ISBN 978-1-84076-112-2.
18. Clark, P., Boardman, W.& Raidal, S.(2009). Collection and handling of blood. *in: Atlas of clinical avian hematology*. 1st edition. John Wiley & Sons. UK. ISBN 978-1-4051-9248-4. p.6.
19. West, G., Heard,D.& Caulkett, N. (2014). *Zoo Animal and Wildlife Immobilization and Anesthesia*. 2nd edition. John Wiley & Sons. UK, USA. ISBN 978-0-8138-1183-3, pp. 139,144,145,171,172,561,562,566,635,720,823,827,832,847,858,864,874.
20. Romagnono, A. & Hadley,T.L. (2016). Sex Differentiation and Reproduction. *in: Exotic Animal Medicine for the Veterinary Technician*. 3rd edition. John Wiley & Sons. USA. ISBN 1118924207, 9781118924204. pp. 89,90.
21. Blood, D.C.,Radostits, O. M.,Arundel,J.H. & Gay, C. C.(1989). *Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. Elsevier Health Sciences. 7nd edition. Baillière Tindall. London. ISBN 0-7020-1286-6. pp. 665.
22. McCain, S., Ramsay, E., Allender, M. C., Souza, C., & Schumacher, J. (2009). Pyometra in captive large felids: a review of eleven cases. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. **40**: 147-151.
23. McCain, S. & Ramsay, E. C. (2011). Pyometra in Large Felids. *in: Fowler's Zoo and Wild Animal Medicine Current Therapy*. Vo.7. Elsevier Health Sciences. St. Louis. Missouri. ISBN 978-1-4377-1986-4. pp. 477,478.
24. Bettencourt, E. Romão, R (2014). *Sebenta Patologia e Clínica de Espécies Pecuárias*. Universidade de Évora. pp. 79-81.
25. Sharma, A., Kumar, P., Singh, M., & Vasishta, N.(2014). Retrospective analysis of dystocia in small ruminants. *Intas Polivet*. **15**: 287-290.
26. Miesner, M. D., & Anderson, D. E. (2008). Management of uterine and vaginal prolapse in the bovine. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. **24**: 409-419.

27. Abdullahi, U. S., & Kumi-Diaka, J. (1986). Prolapse of the nongravid horn in a cow with a seven-month pregnancy: a case report. *Theriogenology*. **26**: 353-356.
28. Baylis, A. M., Page, B., Staniland, I., Arnould, J. P., & McKenzie, J. (2015). Taking the sting out of darting: Risks, restraint drugs and procedures for the chemical restraint of Southern Hemisphere otariids. *Marine Mammal Science*. **31**: 322-344.
29. Arnemo, J. M., Ahlqvist, P., Andersen, R., Berntsen, F., Ericsson, G., Odden, J. & Swenson, J. E.(2006). Risk of capture-related mortality in large free-ranging mammals: experiences from Scandinavia. *Wildlife Biology*. **12**: 109-113.
30. Jones, R.S.(2001). Comparative mortality in anaesthesia. *British Journal of Anaesthesia*. **87**: 813-815.
31. Anderson, K., Garner, M., & Stedman, N.(2016). Retrospective evaluation of histopathologic findings in captive gazelle species. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. **47**: 113-119.
32. Gonçalves, E. B. C.(2014). *Imobilização química em ungulados selvagens*. Tese de Mestrado em Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária, Portugal, pp 10,63.
33. Evans, A. L., Lian, M., das Neves, C. G., Os, Ø., Andersen, R., Aanes, R. & Arnemo, J. M.(2013). Physiologic evaluation of medetomidine-ketamine anesthesia in free-ranging Svalbard (Rangifer tarandus platyrhynchus) and Wild Norwegian Reindeer (Rangifer tarandus platyrhynchus) and Wild Norwegian Reindeer (Rangifer tarandus tarandus). *Journal of wildlife diseases*. **49**: 1037-1041.
34. Georoff, T. A., James, S. B., Kalk, P., Calle, P. P., & Martin-Flores, M. (2010). Evaluation of medetomidine-ketamine-butorphanol anesthesia with atipamezole-naltrexone antagonism in captive male guanacos (Lama guanicoe). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. **41**: 255-262.
35. Ebedes, H. (1993). The use of long-acting tranquillizers in captive wild animals. *in: Capture and care manual*. Wildlife Support Services. South African. pp. 88.
36. Jarrell, H. M.(2011). *Associations between skeletal fractures and locomotor behavior, habitat use, and body mass in nonhuman primates*. Doctoral dissertation, The Ohio State University.
37. Altin, R.C. (2007). Husbandry manual for barbary sheep: Ammotragus lervia. *Western Sydney Institute of TAFE*. Richmond.
38. Guerra, D & Carvalho, L. M. (2012). Hemoparasitoses de Bovinos em Portugal. *Albóitar*.
39. Jongejan, F., & Uilenberg, G(2004). The global importance of ticks. *Parasitology*. **129**: 3-14.

40. Shkap, V., de Vos, A. J., Zwegarth, E., & Jongejan, F. (2007). Attenuated vaccines for tropical theileriosis, babesiosis and heartwater: the continuing necessity. *TRENDS in Parasitology*. **23**: 420-426.
41. Munang'andu, H. M., Siamudaala, V. M., Munyeme, M., & Nalubamba, K. S. (2012). Detection of parasites and parasitic infections of free-ranging wildlife on a game ranch in Zambia: A challenge for disease control. *Journal of parasitology research*. doi:10.1155/2012/296475.
42. Munang'andu, M. H., Siamudaala, V., Munyeme, M., Nambota, A., Mutoloki, S. & Matandiko W. (2010). Trypanosoma brucei Infection in Asymptomatic Greater Kudus (Tragelaphus strepsiceros) on a Game Ranch in Zambia. *The Korean Journal of Parasitology*. **48**: 67-69.
43. Wiethoelter, A.K., Beltrán-Alcrudo, D., Kock, R. & Mor, S.M. (2015). Global trends in infectious diseases at the wildlife–livestock interface. *Proc. Nat. Acad. Sci*. **112**: 9662-9667.
44. Ghai, R. R., Mutinda, M., & Ezenwa, V. O. (2016). Limited sharing of tick-borne hemoparasites between sympatric wild and domestic ungulates. *Veterinary Parasitology*. **226**: 167-173.
45. Eygelaar, D., Jori, F., Mokopasetso, M., Sibeko, K. P., Collins, N. E., Vorster, I. & Oosthuizen, M. C.(2015). Tick-borne haemoparasites in African buffalo (*Syncerus caffer*) from two wildlife areas in Northern Botswana. *Parasites & vectors*. **8**: 1.
46. Fyumagwa, R. D., Runyoro, V., Horak, I. G., & Hoare, R. (2007). Ecology and control of ticks as disease vectors in wildlife of the Ngorongoro Crater, Tanzania. *South African Journal of Wildlife Research*. **37**: 79-90.
47. Cheeran, J. V.(2008). Ungulates. *in: Textbook of wild and zoo animals: care and management*. 2nd edition. IBDC Publishers. INDIA. ISBN: 978-81-8189-222-5. pp. 32-35.
48. Ferrolho, J., Antunes, S., Santos, A.S., Velez,R., Padre, L., Cabezas-Cruz, A., Santos-Silva, M.M.& Domingos, A. (2016). Detection and phylogenetic characterisation of Theileria spp. and Anaplasma marginale in Rhipicephalus bursa in Portugal. *Ticks and Tick-borne Diseases*. **7**: 443-448.
49. Abdela, N., & Bekele, T. (2016). Bovine Theileriosis and its Control: A Review. *Advances in Biological Research*. **10**: 200-212.
50. Anim, J., Ali, Z., Maqbool, A., Muhammad,K., Khan, M.S. & Younis, M. (2013). Prevalence of Theileria annulata infected hard ticks of cattle and buffalo in Punjab, Pakistan. *Pak Veter. J*. **23**: 20–26.

51. Magalhães, A. (2012). *Hemoparasitoses em Bovinos na Região de Portalegre*. Relatório de Estágio em Medicina Veterinária, Universidade do Porto: Instituto de Ciências Biomédicas, Portugal, p.13.
52. Gul, N., Ayaz, S., Gul, I., Adnan, M., Shams, S., & ul Akbar, N. (2015). Tropical Theileriosis and East Coast Fever in Cattle: Present, Past and Future Perspective. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* **4**: 1000-1018.
53. Kocan, K. M. (1995). Targeting ticks for control of selected hemoparasitic diseases of cattle. *Veterinary Parasitology*. **57**: 121-151.
54. Caeiro, V. (1999). General review of tick species present in Portugal. *Parasitologia*. **41**: 11-15.
55. Technical disease cards of Trypanosomes: OIE – World Organization for Animal Health. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/Disease_cards/T_RYPANO_TSETSE.pdf. Acedido em junho de 2016.
56. Baldacchino, F., Muenworn, V., Desquesnes, M., Desoli, F., Charoenviriyaphap, T. & Duvallet, G (2013). Transmission of pathogens by Stomoxys flies (Diptera, Muscidae): a review. *Parasite*. **20**: 26.
57. Baldacchino, F., Krčmar, S., Manon, S., Roy, L. & Jay-Robert, P. (2014). Tabanids in Europe: the result of 8, 000 years of grazing. *In 19th ESOVE Conference*.
58. Kocan, A. A. & Waldrup, K.A. (2001). Blood-inhabiting Protozoans: Piroplasms (Theileria spp., Cytauxzoon spp., and Babesia spp.). *in: Parasitic Diseases of Wild Mammals*. 2nd edition. Iowa State University Press / Ames. IOWA.EUA. ISBN 0-8138-2978-X. pp. 524-536.
59. Roberts, L., Janovy Jr & J., Nadler, S. (2012). Phylum Apicomplexa: Malaria Organisms and Piroplasms; Kinetoplasta: Trypanosomes and Their Kin. *in: Gerald D. Schmidt & Larry S. Roberts' Foundations of Parasitology*. 9th edition. McGraw-Hill Education. NY. EUA. ISBN 978-0-07-352419-1. pp. 61-71, 160-165.
60. Konnai, S., Mekata, H., Odbileg, R., Simuunza, M., Chembensof, M., Witola, W. H. & Ohashi, K. (2008). Detection of Trypanosoma brucei in field-captured tsetse flies and identification of host species fed on by the infected flies. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. **8**: 565-574.
61. Tyler, K. M., & Engman, D. M. (2001). The life cycle of Trypanosoma cruzi revisited. *International journal for parasitology*. **31**: 472-481.
62. Dumesa, T. & Demessie, Y. (2015). Review on Tsetse Transmitted Bovine Trypanosomosis in Ethiopia. *European Journal of Applied Sciences*. **7**: 255-267.

63. Batista, J. S., Riet-Correa, F., Teixeira, M. M. G., Madruga, C. R., Simões, S. D. V. & Maia, T. F. (2007). Trypanosomiasis by *Trypanosoma vivax* in cattle in the Brazilian semiarid: Description of an outbreak and lesions in the nervous system. *Veterinary parasitology*. **143**: 174-181.
64. Ventura, R. M., Paiva, F., Silva, R. A., Takeda, G. F., Buck, G. A., & Teixeira, M. M. (2001). *Trypanosoma vivax*: characterization of the spliced-leader gene of a Brazilian stock and species-specific detection by PCR amplification of an intergenic spacer sequence. *Experimental Parasitology*. **99**: 37-48.
65. Taylor, K. & Authié, E.M.L. (2004). Pathogenesis of Animal Trypanosomiasis. in: *The Trypanosomiases*. 1st edition. CABI Publishing. UK. ISBN 0 85199 475 X. pp.331,332.
66. Francia, M. E., & Striepen, B. (2014). Cell division in apicomplexan parasites. *Nature Reviews Microbiology*. **12**: 125-136.
67. Shaw, M. K. (2003). Cell invasion by *Theileria* sporozoites. *Trends in parasitology*. **19**: 2-6.
68. Mans, B. J., Pienaar, R., & Latif, A. A.(2015). A review of *Theileria* diagnostics and epidemiology. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*. **4**: 104-118.
69. Technical disease cards of Theileriosis: OIE – World Organization for Animal Health. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/Disease_cards/THEILERIOSIS.pdf. Acedido em junho de 2016.
70. Oura, C. A., Tait, A., Asiimwe, B., Lubega, G. W., & Weir, W.(2011). *Theileria parva* genetic diversity and haemoparasite prevalence in cattle and wildlife in and around Lake Mburo National Park in Uganda.. *Parasitology research*. **108**: 1365-1374.
71. Bruce, D.B., Hamerton, A.E., Bateman, H.R. & Mackie, F.P. (1910). Amakebe: a disease of calves in Uganda. *Proceedings of the Royal Society*. **82**: 256–272.
72. Perry, B. D. (2016). The control of East Coast fever of cattle by live parasite vaccination: A science-to-impact narrative. *One Health*. **2**: 103-114.
73. Preston, P. M., Brown, C. G. D., Bell-Sakyi, L., Richardson, W., & Sanderson, A.(1992). Tropical theileriosis in *Bos taurus* and *Bos taurus* cross *Bos indicus* calves: response to infection with graded doses of sporozoites of *Theileria annulata*. *Research in veterinary science* . **53**: 230-243.
74. Branco, S., Orvalho, J., Leitão, A., Pereira, I., Malta, M., Mariano, I. & Peleteiro, M. C.(2010). Fatal cases of *Theileria annulata* infection in calves in Portugal associated with neoplastic-like lymphoid cell proliferation. *Journal of veterinary science*. **11**: 27-34.

75. Nichani, A.K., Thorp, B.H., Brown, C.G.D., Campbell, J.D.M., Brown, D.J., Ritchie, M. & Spooner, R.L. (1999). In vivo development of *Theileria annulata*: major changes in efferent lymph following infection with sporozoites or allogeneic schizont-infected mononuclear cells. *Parasitology*. **118**:327–333.
76. Yabsley, M. J., & Shock, B. C. (2013). Natural history of zoonotic *Babesia*: role of wildlife reservoirs. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*. **2**:18-31.
77. Technical disease cards of Bovine Babesiosis: OIE – World Organization for Animal Health. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/Disease_cards/BOVINE_BABESIOSIS.pdf. Acedido em junho de 2016.
78. Hunfeld, K. P., Hildebrandt, A. & Gray, J. S. (2008). Babesiosis: recent insights into an ancient disease. *International journal for parasitology*. **38**: 1219-1237.
79. Howell, J. M., Ueti, M. W., Palmer, G. H., Scoles, G. A., & Knowles, D. P. (2007). Transovarial transmission efficiency of *Babesia bovis* tick stages acquired by *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* during acute infection. *Journal of clinical microbiology*. **45**: 426-431.
80. Bock, R., Jackson, L., De Vos, A. & Jorgensen, W. (2004). Babesiosis of cattle. *Parasitology*. **129**: 247-269.
81. Elsify, A., Sivakumar, T., Nayel, M., Salama, A., Elkhtam, A., Rizk, M. & Yokoyama, N. (2015). An epidemiological survey of bovine *Babesia* and *Theileria* parasites in cattle, buffaloes, and sheep in Egypt. *Parasitology international*. **64**: 79-85.
82. Michel, A. O., Mathis, A., & Ryser-Degiorgis, M. P.(2014). *Babesia* spp. in European wild ruminant species: parasite diversity and risk factors for infection. *Veterinary research*. **45**: 65.
83. Schnittger, L., Rodriguez, A. E., Florin-Christensen, M., & Morrison, D. A. (2012). *Babesia*: a world emerging. *Infection, Genetics and Evolution*. **12**: 1788-1809.
84. Oliveira, M. C. S., Oliveira-Sequeira, T. C. G., Regitano, L. C. A., Alencar, M. M., Néo, T. A., Silva, A. M., & Oliveira, H. N. D.(2008). Detection of *Babesia bigemina* in cattle of different genetic groups and in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tick. *Veterinary parasitology*. **155**: 281-286.
85. Herwaldt, B. L., Cacciò, S., Gherlinzoni, F., Aspöck, H., Slemenda, S. B., Piccaluga, P. & Pampiglione, S. (2003). Molecular characterization of a non-*Babesia divergens* organism causing zoonotic babesiosis in Europe. *Emerg Infect Dis*. **9**: 942-948.
86. Penzhorn, B. L. (2006). Babesiosis of wild carnivores and ungulates. *Veterinary parasitology*. **138**: 11-21.

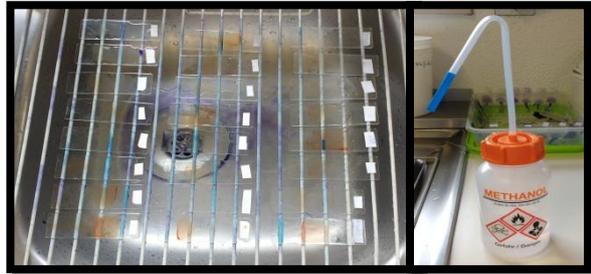
87. Pothmann, D., Poppert, S., Rakotozandrindrainy, R., Hogan, B., Mastropaolo, M., Thiel, C. & Silaghi, C. (2016). Prevalence and genetic characterization of *Anaplasma marginale* in zebu cattle (*Bos indicus*) and their ticks (*Amblyomma variegatum*, *Rhipicephalus microplus*) from Madagascar. *Ticks and Tick-borne Diseases*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.08.013>.
88. Kocan, K. M., De La Fuente, J., Blouin, E. F., & Garcia-Garcia, J. C. (2004). *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae): recent advances in defining host–pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia. *Parasitology*. **129**: 285-300.
89. de la Fuente, J., Ruiz-Fons, F., Naranjo, V., Torina, A., Rodríguez, O., & Gortázar, C. (2008). Evidence of *Anaplasma* infections in European roe deer (*Capreolus capreolus*) from southern Spain. *Research in veterinary science*. **84**: 382-386.
90. Blouin, E. F., Kocan, K. M., de la Fuente, J., & Saliki, J. T. (2002). Effect of tetracycline on development of *Anaplasma marginale* in cultured *Ixodes scapularis* cells. *Veterinary parasitology*. **107**: 115-126.
91. Kocan, K. M., de la Fuente, J., Blouin, E. F., Coetzee, J. F., & Ewing, S. A. (2010). The natural history of *Anaplasma marginale*. *Veterinary parasitology*. **167**: 95-107.
92. Tucker, T. R., Aly, S. S., Maas, J., Davy, J. S. & Foley, J. E. (2016). Investigation of *Anaplasma marginale* Seroprevalence in a Traditionally Managed Large California Beef Herd. *Veterinary Medicine International*. doi:10.1155/2016/6186078.
93. Munderloh, U. G., Lynch, M. J., Herron, M. J., Palmer, A. T., Kurtti, T. J., Nelson, R. D. & Goodman, J. L. (2004). Infection of endothelial cells with *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum*. *Veterinary microbiology*. **101**: 53-64.
94. O'Sullivan, M. V., Zhou, F., Sintchenko, V., Kong, F. & Gilbert, G. L. (2011). Multiplex PCR and reverse line blot hybridization assay (mPCR/RLB). *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. **54**-2781-2781.
95. Normais Climatológicas - 1981-2010 (provisórias) - Setúbal;Clima de Portugal Continental.Instituto Português do Mar e Atmosfera. <http://www.ipma.pt/pt/oclima/normais.clima/1981-2010/019>. Acedido em Junho de 2016.
96. Caprette, D.R. Examining a Mammalian Blood Smear.Experimetal Biosciences - Resources for introductory and intermediate level laboratory courses. <http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/studies/sds-page/bloodcytology.html>. Acedido em junho de 2016.
97. Smear examination.Eclinpath.Cornell University College of Veterinary University. <http://www.eclinpath.com/hematology/hemogram-basics/blood-smear-examination>. Acedido em junho de 2016.

98. Narasimha, A., Kumar, H., & Prasad, C. S. B. R. (2008). Anticoagulant induced artefacts in peripheral blood smears. *Narasimha, A., Kumar, H., & Prasad, C. S. B. R.* **24**: 43-48.

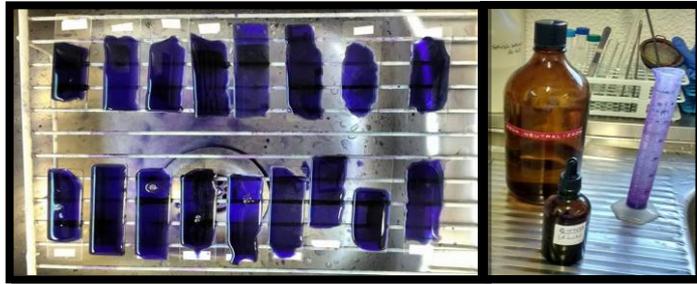
7. Anexos

Anexo I – Técnica de Coloração Giemsa (coloração rápida)

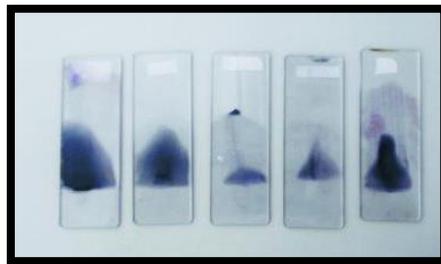
- Fixar com álcool metílico, durante cinco minutos, os esfregaços sanguíneos perfeitamente secos e deixar evaporar completamente;



- Corar com solução Giemsa diluído* durante 15 a 20 minutos;



- Lavar com água destilada neutralizada (sem verter o corante);
- Deixar secar completamente.



*Giemsa diluído – 24 gotas de corante Giemsa (filtrado) para 10ml de água destilada neutralizada.

Anexo II – Tabela com os resultados obtidos da análise dos esfregaços sanguíneos de ungulados selvagens ao microscópio ótico

Ungulados Selvagens								
Amostra	Espécie	Sexo	Idade	Colheita	<i>Babesia</i> sp.	<i>Theileria</i> sp.	<i>Trypanosoma</i> sp.	<i>Anaplasma</i> sp.
1	<i>Cervus Elaphus</i>	M	SA	SP	-	+	-	+
2	Carraça	-	-	SP	-	-	-	-
3	<i>Cervus Elaphus</i>	F	SA	SP	-	+	-	+
4	<i>Syncerus caffer nanus</i>	F	A	EDTA	-	+	-	+
5		M	A	EDTA	-	-	-	-
6		F	SA	EDTA	-	-	-	+
7		F	A	EDTA	-	-	-	+
8	<i>Axis axis</i>	M	SA	EDTA	-	-	-	-
9		F	SA	EDTA	-	-	-	+
10		F	A	SP	-	-	-	+
11		M	A	SP	-	-	-	-
12		M	SA	EDTA	-	+	-	+
13		M	SA	EDTA	-	-	-	-
14		M	SA	EDTA	-	-	-	-
15		M	SA	EDTA	-	-	-	-
16		F	SA	SP	-	-	-	-
17		F	A	EDTA	-	-	-	-
18	<i>Ammotragus lervia</i>	M	SA	EDTA	-	+	-	+
19		M	SA	EDTA	-	-	-	-
20		F	A	EDTA	-	+	-	+
21		M	A	EDTA	-	-	-	-
22		F	SA	EDTA	-	+	-	+
23		M	SA	EDTA	-	-	-	-
24		M	SA	SP	-	+	-	-
25		M	SA	SP	-	-	-	-
26		F	SA	SP	-	+	-	-
27		F	A	SP	-	-	-	-
28	<i>Kobus leche</i>	M	A	SP	-	-	-	+
29		M	SA	SP	-	+	-	-
30		M	SA	SP	-	-	-	-
31		F	A	SP	-	+	-	+
32		F	A	SP	X	X	X	X
33		F	A	SP	-	-	-	-
34	Búfalo afro-asiático	M	A	SP	-	+	-	-
35		M	A	SP	-	-	-	-
36		M	A	SP	-	-	-	-
37		F	A	SP	-	-	-	-
38	<i>Taurotragus oryx</i>	F	A	SP	-	-	-	-

Anexo III – Tabela com os resultados obtidos da análise dos esfregaços sanguíneos de ungulados domésticos ao microscópio ótico

Ungulados Domésticos								
Esfregaço	Espécie	Sexo	Idade	Colheita	<i>Babesia sp.</i>	<i>Theileria sp.</i>	<i>Trypanosoma sp.</i>	<i>Anaplasma sp.</i>
39	<i>Equus asinus</i>	F	A	SP	-	-	-	-
40		F	A	SP	-	-	-	-
41		F	A	SP	-	-	-	-
42		F	A	SP	-	-	-	+
43		F	A	SP	-	-	-	-
44	<i>Capra aegragus hircus</i>	M	SA	SP	-	-	-	+
45		F	A	SP	-	-	-	+
46		F	A	SP	-	-	-	-
47		F	A	SP	-	-	-	-
48		F	A	SP	-	-	-	-
49		F	SA	SP	-	-	-	-
50		M	A	SP	-	-	-	-
51		F	A	SP	-	-	-	-
52		F	A	SP	-	-	-	-
53		F	SA	SP	-	+	-	+
54		F	SA	SP	-	-	-	-
55		F	A	SP	-	-	-	+
56	F	A	SP	-	-	-	+	
57	<i>Ovis aries</i>	F	SA	SP	-	-	-	+
58	<i>Capra girgentana</i>	M	A	SP	-	-	-	+
59		F	A	SP	-	-	-	+
60		F	A	SP	-	-	-	+