

Percepção da besnoitiose bovina em Portugal - Questionário aos Médicos Veterinários de campo

Perception of bovine besnoitiosis in Portugal - Questionnaire to veterinary field practitioners

Helga Waap^{1*}, Telmo Nunes², Helder Cortes³, Alexandre Leitão⁴, Yolanda Vaz^{2*}

¹UEISPSA, Laboratório de Parasitologia, Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, Lisboa

²CHISA (Centro Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal) Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (FMV-UL), Lisboa

³CAAM Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas, Laboratório de Parasitologia Victor Caeiro, Évora

⁴IICT Instituto de Investigação Científica Tropical, CVZ; CHISA, FMV-UL, Lisboa

Resumo: A besnoitiose bovina, causada por *Besnoitia besnoiti*, é uma doença reemergente na Europa, associada a consideráveis prejuízos económicos. Embora em Portugal esta doença seja geralmente atribuída ao Alentejo, recentemente foram detetadas explorações serologicamente positivas nas regiões Norte e Centro, bem como os primeiros casos clínicos na Beira Interior. Uma vez que o quadro clínico pode ser confundido com outras afeções, estima-se que a doença esteja sub-diagnosticada, particularmente em áreas não-endémicas ou regiões onde tenha sido recentemente introduzida. O objetivo deste estudo foi colher informações junto dos médicos veterinários (MV) de campo, para avaliar a percepção geral da besnoitiose bovina. Entre janeiro-março 2013 foi enviado um questionário *online* a todos os MV coordenadores das OPP em Portugal continental. As respostas ao questionário mostraram que o conhecimento da doença é geograficamente limitado, acompanhando a concentração de casos no Alentejo. Os MV com experiência clínica (n=14) pertenciam aos distritos Santarém, Lisboa, Setúbal, Évora, Beja e Portalegre, enquanto as respostas indicando desconhecimento da doença (n=66) vieram sobretudo do Norte do país. Em 2013, os MV que responderam ao inquérito detetaram casos em 22 explorações em 14 concelhos no Alentejo. O refugo dos animais doentes, adotado por 71,4%, foi a estratégia de eleição no combate à doença. A maioria dos MV familiarizados com a doença (71,4%) atribuiu-lhe uma importância económica média a alta. Estes resultados sublinham a necessidade de divulgar o quadro clínico e os recursos laboratoriais disponíveis pelos MV e produtores pecuários, de modo a promover a deteção precoce da doença.

Summary: Bovine besnoitiosis, caused by *Besnoitia besnoiti*, is a re-emergent disease, which is linked to considerable economical losses in Europe. Although in Portugal bovine besnoitiosis is generally associated to the Alentejo, recently, seropositive farms were identified in the North and Centre and the first clinical cases were detected in Beira Interior. Since clinical signs can be confounded with other conditions, bovine besnoitiosis may be an under-diagnosed disease, particularly in non-endemic areas or in regions where it has been recently introduced. The aim of this study was to collect information from veterinary field practitioners (MV) in order to evaluate the general perception of bovine besnoitiosis. An online questionnaire was sent between January-March 2013 to all coordinators of the farmer producer's orga-

nizations in mainland Portugal. Responses to the questionnaire showed that knowledge on the disease is geographically limited, accompanying the concentration of cases in Alentejo. MV with clinical experience (n=14) were from the districts Santarém, Lisbon, Setúbal, Évora, Beja and Portalegre while answers indicating unawareness of the disease (n=66) came mainly from the north of Portugal. In 2013, the respondents detected cases in 22 farms in 14 counties in Alentejo. The culling of symptomatic animals, adopted by 71.4%, was the preferred control strategy. The majority of practitioners with clinical experience (71.4%) considered that bovine besnoitiosis has a medium to high economic importance. The present findings underline the need to disseminate information on the clinical picture and available laboratory resources among MV and livestock producers in order to promote early detection of the disease.

Introdução

A besnoitiose bovina é provocada pelo parasita intracelular obrigatório *Besnoitia besnoiti*, um protozoário Apicomplexa pertencente ao grupo das coccídeas formadoras de quistos que apresenta semelhanças morfológicas e genéticas com os géneros *Toxoplasma*, *Neospora* e *Sarcocystis*. Este grupo de parasitas tem, regra geral, um ciclo de vida do tipo predador-presa, com um hospedeiro definitivo carnívoro e um hospedeiro intermediário que alberga o parasita sob a forma de quistos. O ciclo de vida de *B. besnoiti* é, todavia, desconhecido, uma vez que ainda não foi identificado o hospedeiro definitivo (Diesing *et al.*, 1988; Jacquet *et al.*, 2010). Apesar de vários animais, nomeadamente gerbilos (Shkap *et al.*, 2002), ratos (Schares *et al.*, 2009), coelhos, ovelhas e cabras (Pols, 1960) serem experimentalmente susceptíveis à infecção, os bovinos, e possivelmente algumas espécies de antílopes, são os únicos hospedeiros naturais conhecidos (Ellis *et al.*, 2000; Jacquet *et al.*, 2010).

A transmissão mecânica através de insectos hematófagos tem sido sugerida com base na localização cutânea dos quistos e na maior incidência da doença nos meses

*Correspondência: helga.waap@iniav.pt, Telefone: 217115231

de verão, quando os artrópodes são mais ativos. No entanto, apenas foi possível confirmar o estabelecimento de infecções sub-clínicas através de tabanídeos, glossinas e moscas de estábulo (Bigalke, 1968).

A besnoitiose bovina evolui em duas fases distintas: uma fase aguda de anasarca, associada a uma parasitemia intensa e multiplicação dos taquizoítos, e uma fase crónica de esclerodermia, associada à formação de quistos.

A fase aguda caracteriza-se por uma síndrome febril pronunciada, com anorexia, taquicardia, taquipneia, diminuição da atividade ruminal e hipertermia (40-41°C). Os animais apresentam frequentemente congestão do focinho, pele periorbital e escroto, mais visível nos animais de pelagem clara. A inflamação aguda das mucosas oculares e pituitária, associada à proliferação local do parasita, provoca um corrimento nasal e ocular seroso e abundante. Os edemas resultam das alterações degenerativas e necróticas, vasculite e trombose provocadas pela multiplicação do parasita nas pequenas e médias veias e podem variar desde ligeira tumefação do focinho, espessamento das pregas da pele do pescoço, dorso e tórax, até edema subcutâneo generalizado (anasarca). Muitas vezes, observam-se somente nas zonas de declive (barbela, esterno, prepúcio, membros), podendo mesmo passar despercebidos. A pele dos animais encontra-se quente, espessa e dolorosa à palpação. As fêmeas podem apresentar congestão do úbere e dos tetos e os machos orquites dolorosas, com infertilidade transitória ou definitiva. Nesta fase, o predomínio de sinais inespecíficos torna o diagnóstico difícil, podendo a doença ser confundida com doença respiratória dos bovinos, febre catarral maligna, babesiose, fotossensibilidade aguda e insuficiência cardíaca, devido à acumulação de líquidos nas pernas e regiões ventrais (Bigalke e Prozesky, 2004; Alzieu *et al.*, 2007).

A fase crónica corresponde à fase de formação de quistos, preferencialmente no tecido conjuntivo, sobretudo na derme, trato respiratório superior, vasos sanguíneos, aponevroses e periósteo. Estes quistos começam a ser visíveis na conjuntiva da esclera, mucosa nasal e vulvar 6-7 semanas após a subida inicial da temperatura e os sinais clínicos mais evidentes são o espessamento e pregueamento da pele (Figura 1).



Figura 1 - Sinais característicos da fase crónica da besnoitiose bovina

Três a quatro semanas após o início da febre, os animais podem desenvolver um inchaço marcado das pernas, o que torna o movimento difícil e doloroso. A doença evolui com alopecia progressiva, dermatite com hiperqueratose, formação de crostas e fissuras profundas entre as pregas de pele. As lesões cutâneas podem ser confundidas com sarna sarcóptica, pediculose, dermatofilose, paraqueratose e fotossensibilidade, entre outras (Bigalke e Prozesky, 2004; Álvarez-García *et al.*, 2013). Nos casos graves observa-se corrimento nasal mucopurulento com formação de crostas nas narinas e dificuldade respiratória. Os animais apresentam geralmente linfadenopatia superficial, hipertermia ligeira, que se prolonga durante várias semanas, anorexia e emaciação. Na fase crónica, a infertilidade nos machos é geralmente definitiva, devido a orquite severa, com necrose, calcificação e atrofia testicular. Nas formas severas, a esclerodermia e alopecia persistem, embora se verifique uma melhoria gradual da aparência dos animais (Bigalke e Prozesky, 2004). A morte dos animais pode ocorrer tanto na fase aguda, como na fase de esclerodermia (Álvarez-García *et al.*, 2013).

Não obstante a morbidade e mortalidade serem geralmente baixas (<10%), a sua importância económica é frequentemente associada a prejuízos na produção de carne e peles, infertilidade nos machos, refugo de animais, reprovações no matadouro e mortalidade (Pols, 1960). A inexistência de tratamento e de vacinas seguras e eficazes, o desconhecimento do seu ciclo de vida, bem como a baixa consciencialização de médicos veterinários (MV) e produtores para esta doença, dificultam a implementação de estratégias de prevenção e controlo (Cortes *et al.*, 2007; Shkap *et al.*, 1987).

Apesar de a etiologia da besnoitiose bovina ter sido estabelecida pela primeira vez na Europa (Besnoit e Robin, 1912), durante várias décadas, foi considerada uma doença tropical, prevalente em diversas regiões de África, Médio Oriente e Ásia (Pols, 1960; Bigalke e Prozesky, 2004). Em Portugal, as primeiras descrições datam de 1885 (Franco e Borges, 1915). Após um longo período sem registo de novos casos, a besnoitiose foi novamente diagnosticada no final da década de 80, no Alentejo (Malta e Silva, 1991). Desde aí, o número de explorações infetadas tem vindo a aumentar, atingindo presentemente vários concelhos nesta região (Cortes *et al.*, 2005; 2006). Noutros países da Europa constatou-se um padrão de expansão e aumento de incidência similar, o que motivou a sua classificação como doença emergente pela Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA, 2010). A besnoitiose bovina afeta presentemente Espanha (Juste *et al.*, 1990; Fernandez-García *et al.*, 2009), França (Bordeau *et al.*, 2004; Alzieu *et al.*, 2007), Itália (Agosti *et al.*, 1994; Gollnick *et al.*, 2010;), Alemanha (Mehlhorn *et al.*, 2009; Shares *et al.*, 2009), Suíça (Lesser *et al.*, 2012), Croácia (Beck *et al.*, 2013), Hungria (Hornok *et al.*, 2014), Irlanda (<http://promedmail.org/direct.php?id=20150722.3529378>) e Bélgica (Vanhoudt *et al.*, 2015).

Em 2013, foi realizado um rastreio serológico para determinar a prevalência e distribuição geográfica de *B. besnoiti* em Portugal continental (Waap *et al.*, 2014). Neste estudo, que envolveu 391 explorações em 83 concelhos, determinou-se uma prevalência de explorações infetadas de 5,1% (Intervalo de Credibilidade: 3,1%-7,8%) e uma prevalência média intraexploração de 33,0% [Intervalo de Credibilidade: 20,3%-46,0%]. Embora neste rastreio se tenha identificado um agregado espacial de explorações afetadas no Alentejo, pela primeira vez foram também detetadas explorações serologicamente positivas nas regiões Norte e Centro do país. Os primeiros casos clínicos a norte do Tejo viriam a ser diagnosticados pouco tempo depois, nos concelhos de Castelo Branco e Idanha-a-Nova (Meireles *et al.*, 2014). Face a esta evidência, e uma vez que o quadro clínico da doença pode ser confundido com outras afeções cutâneas, estima-se que a besnoitiose bovina possa encontrar-se sub-diagnosticada em Portugal. A partilha da experiência dos médicos veterinários (MV) de campo é por isso essencial para conhecer a prevalência e a extensão geográfica dos casos de besnoitiose bovina e avaliar o grau de informação e alerta para esta doença. Uma vez que os questionários *online* oferecem a vantagem de poderem ser divulgados por um grande número de pessoas de diversas zonas geográficas, optámos por esta metodologia para colher informações junto dos Médicos Veterinários (MV) envolvidos na clínica de bovinos.

Material e métodos

O questionário foi construído no programa Google Docs, um pacote de aplicativos gratuito *online* do Google. O *link* para o formulário foi enviado por correio electrónico a todos os MV coordenadores das Organizações de Produtores Pecuários (OPP) em Portugal continental constantes da base de dados da DGAV à data (n=108). Acompanhando este e-mail, foi enviada uma carta introdutória, com a explicação do âmbito e dos objetivos do questionário, solicitando o reencaminhamento do mesmo para os MV executores das OPP. A fim de aumentar a sua divulgação, o questionário foi também enviado a outros colegas direta ou indiretamente envolvidos na clínica de bovinos, com o pedido de reencaminhamento para a rede de conhecimentos de MV na mesma área. O acesso online ao formulário foi mantido durante os meses de janeiro a março de 2013.

O questionário foi concebido de forma a poder extrair informações relevantes relativamente à experiência dos inquiridos com a doença e à localização geográfica dos casos observados. O formulário foi dividido em duas partes: uma de perguntas exclusivamente para os MV familiarizados com a besnoitiose bovina e outra destinada aos MV que conhecem a doença mas que nunca viram casos clínicos ou que nunca ouviram falar da doença.

Resultados

Fechado o acesso *online* ao questionário, obtivemos um total de 80 respostas válidas. Três respostas foram eliminadas por duplicação ou dados incompletos. Relativamente ao grau de informação sobre a doença, 17,5% (14) dos inquiridos já tinham observado casos clínicos, 72,5% (58) tinham conhecimento mas nunca viram animais com sinais clínicos e 10% (8) nunca ouviram falar em besnoitiose bovina (Figura 2).

Os MV com experiência de campo de besnoitiose bovina responderam à parte I do questionário e os restantes à parte II. As respostas foram obtidas de 16 distritos de Portugal continental e da região autónoma dos Açores. Não obtivemos respostas dos distritos de Coimbra e Faro e da região autónoma da Madeira. Não nos foi possível apurar a área de intervenção de 10 dos MV que responderam à parte II do questionário (conhecimento mas nunca viram). Os MV que já diagnosticaram a doença indicaram como áreas de intervenção os distritos pertencentes às regiões NUTS 2 Alentejo e Lisboa. Os distritos com um maior número de MV que já contactaram com a doença foram Setúbal (2/2 MV; 100%) e Évora (5/6; 83,3%), seguidos de Portalegre (5/7 MV; 71,4%), Beja (5/11; 45,5%), Santarém (2/6; 33,3%) e Lisboa (1/5; 20%). Todas as respostas indicando desconhecimento da doença reportaram-se à região Norte do país, com exceção de um dos inquiridos (1/7; 16,7%), de Portalegre. Os distritos com maior número de MV que admitiram nunca ter ouvido falar em besnoitiose bovina foram Viana do Castelo (3/5; 60%) e Bragança (2/4; 50%), seguidos de Aveiro (1/3; 33,3%), Porto (1/5; 20%), Vila Real (1/5; 20%), Viseu (1/5; 20%), Portalegre (1/7; 14,3%) e Braga (1/8; 12,5%) (Figura 1). Os restantes, incluindo os 2 MV da região autónoma dos Açores, tinham conhecimento da doença, mas nunca viram casos.

Respostas à primeira parte do questionário (MV com experiência de campo de besnoitiose bovina)

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

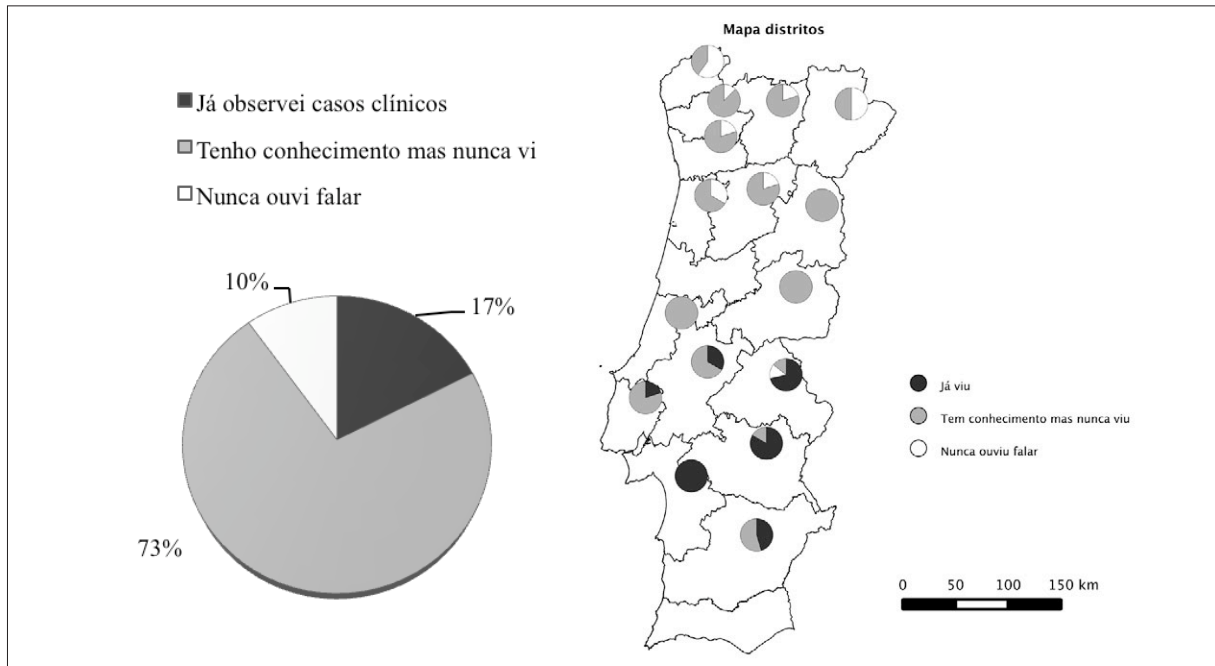


Figura 2 - Percentagem e distribuição por distrito das respostas relativamente ao grau de conhecimento da besnoitiose bovina em Portugal continental

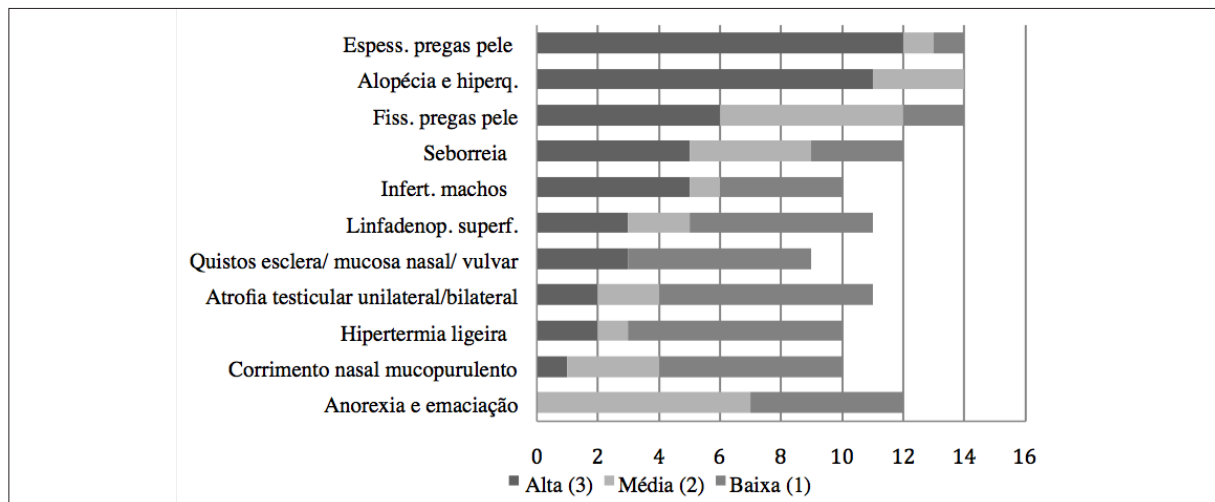


Figura 3 - Opinião sobre a frequência dos sinais da fase aguda da besnoitiose bovina (n=6).

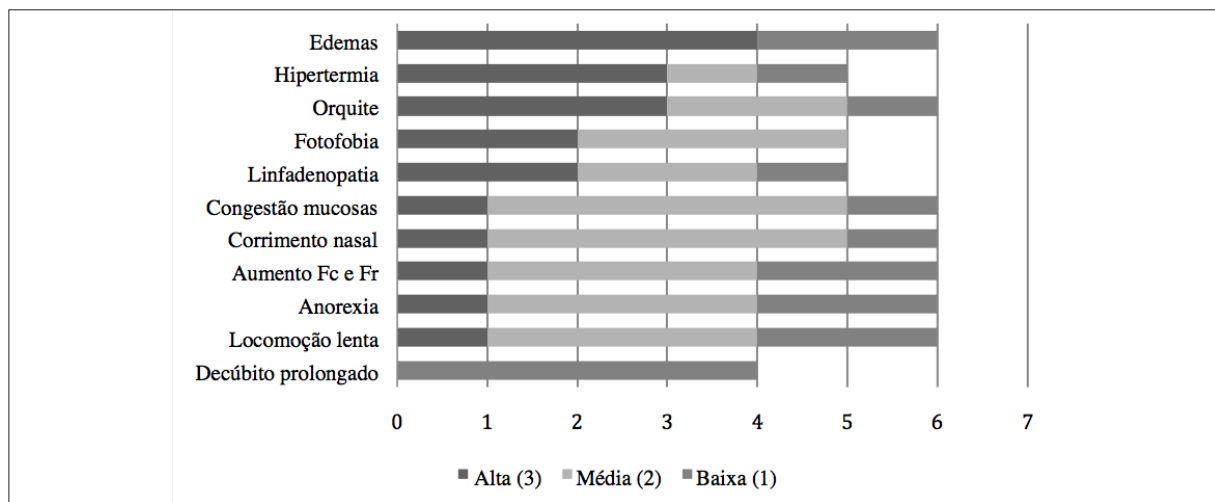


Figura 4 - Opinião sobre a frequência dos sinais crónicos da besnoitiose bovina (n=14).

trimestre outubro-dezembro, 4 (57,1%) dos inquiridos consideraram a frequência da doença baixa, 7 (14,3%) média e os restantes (28,6%) alta.

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

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

No que respeita aos métodos de diagnóstico utilizados, metade dos MV (7/14) recorreu ao diagnóstico laboratorial e a outra metade baseou-se exclusivamente na observação dos sinais clínicos. Dos MV que utilizaram o diagnóstico laboratorial, um (14,3%) indicou a ELISA, 2 (28,6%) a IFI, mas 4 (57,1%) não se recordavam da técnica utilizada pelo laboratório. Dez MV (71,4%) adotaram medidas preventivas. O “refugo dos animais doentes” foi a medida de eleição, tendo sido adotada por todos (10/10). Oito MV optaram ainda por separar os animais infetados, 5 reforçaram o tratamento inseticida, 4 adotaram a medida “rastreamento dos animais adquiridos” e outros 4 a medida “refugo dos animais serologicamente positivos”. Dois dos inquiridos basearam-se apenas no refugo dos animais doentes enquanto 8 combinaram duas ou mais medidas de prevenção (Figura 5).

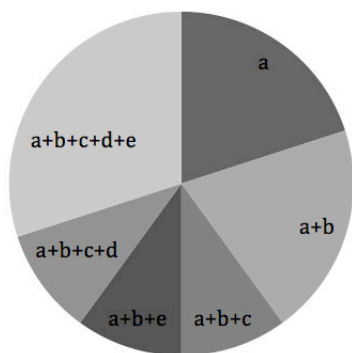


Figura 5 - Respostas relativas às medidas e combinações de medidas adotadas pelos MV (n=10) para a prevenção da besnoitiose bovina. Refugo animais doentes (a), separação dos animais infectados (b), reforço tratamento inseticida (c), rastreamento animais adquiridos (d), refugo animais serologicamente positivos (e)

Em relação à observação de casos de besnoitiose no ano de 2013, 8 MV (57,1%) responderam afirmativamente. Estes diagnósticos ocorreram em 22 explorações, distribuídas por 14 concelhos: Portalegre, Ponte de Sôr, Alter do Chão, Santarém, Mora, Monforte, Estremoz, Elvas, Arraiolos, Montemor, Portel, Alandroal, Reguengos de Monsaraz e Crato. Os casos nos concelhos de Reguengos de Monsaraz, Portel e Ponte de Sôr, foram detetados pela primeira vez em 2013, sendo a besnoitiose bovina conhecida nos outros concelhos anteriormente a 2013. Para além dos concelhos referidos, a besnoitiose tinha sido também diagnosticada pelos inquiridos nos últimos 5 anos nos concelhos de Alcácer do Sal, Alvíto, Aviz, Coruche, Cuba, Ferreira, Lisboa, Moura e Odemira (Figura 6).

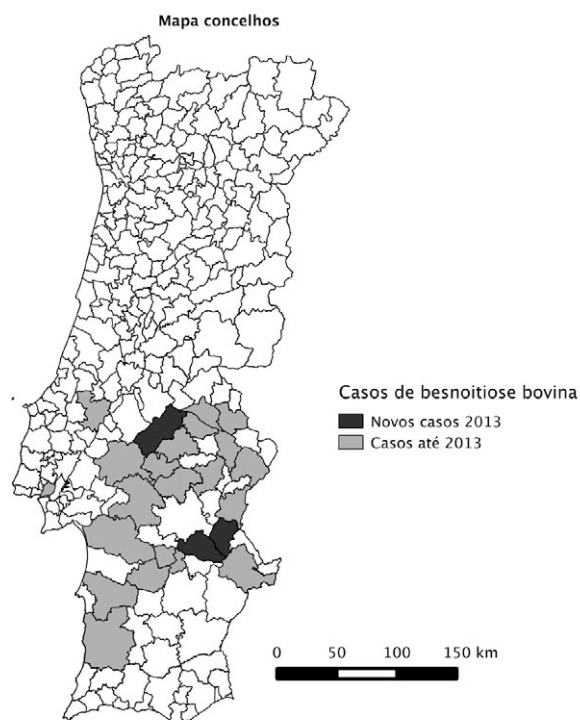


Figura 6 - Distribuição geográfica dos casos clínicos de besnoitiose bovina por concelho.

Relativamente à questão sobre o número de animais com manifestações clínicas e o número de mortes nas explorações infetadas em 2013, obtivemos dados sobre 20 explorações. Em 13 destas explorações (65%) foram observados 1-2 animais com sinais clínicos, 5 (25%) explorações apresentavam 3-5 animais com sinais clínicos, numa exploração (5%) foram diagnosticados 5-10 animais com sinais clínicos e noutra (5%) mais de 10 animais. Em relação a mortes provocadas pela doença, em 85% das explorações (17/20) não se verificou nenhuma e nas restantes ocorreram 1-2 casos.

No que respeita à avaliação da importância económica da doença, feita pelos inquiridos, 4 (28,6%) atribuíram-lhe uma importância baixa, 9 (64,3%) uma importância média ou média alta e 1 (7,1%) considerou a sua importância elevada.

Respostas à segunda parte do questionário (MV com conhecimento mas sem experiência clínica da doença e MV sem conhecimento)

Depois de consultar a página com a descrição e imagens das principais manifestações cutâneas e reprodutivas da besnoitiose bovina, apenas os MV informados sobre a doença admitiram poder ter observado sinais clínicos compatíveis com besnoitiose bovina nos últimos 5 anos (16,7%). Quanto aos sinais observados, das várias combinações possíveis, 10 MV assinalaram “apenas sinais cutâneos” e um observou “sinais cutâneos e infertilidade nos machos”. Relativamente aos sinais cutâneos, 10 MV referiram “espessamento e preegreamento da pele”, 9 MV “alopécia e hiperqueratose”, 4 MV “seborreia” e 2 MV observaram “quistos na conjuntiva da esclera ou mucosa nasal/vulvar”. A sarna destacou-se entre as causas contempladas no diagnóstico diferencial das manifestações cutâneas, com 63,6% das respostas, seguida de carências minerais (27,3%), agentes tóxicos (9,1%), hipersensibilidade (9,1%) e pediculose (9,1%). Em 27,3% dos casos, não foi atribuída qualquer etiologia. Os sinais do aparelho reprodutor observados por um dos MV foram atrofia testicular e infertilidade nos machos. No diagnóstico diferencial dos sinais reprodutivos, das várias hipóteses colocadas no questionário (IBR, BVD, Brucelose, outras) a suspeita foi de IBR. Quatro MV (36,4%) consideraram que a besnoitiose bovina poderá ter provocado a morte dos animais na exploração. Os sinais clínicos foram detetados pelos inquiridos ao longo de todo o ano, com destaque para o trimestre julho-setembro (72,7%) comparativamente aos trimestres outubro-dezembro (63,6%), janeiro-março (54,5%) e 5 abril-junho (45,5%). A frequência de casos foi considerada maioritariamente baixa, com exceção do trimestre julho-setembro, em que 4 (62,5%) dos MV lhe atribuíram uma frequência média.

Quando questionados especificamente em relação ao ano 2013, quatro dos MV (40%) que observaram apenas sinais cutâneos referiram os concelhos Almodôvar, Benavente, Ponte de Lima, Viseu e Leiria (Figura 6), num total de 5 explorações. O número de animais afetados por exploração foi de 1-2. Quanto aos últimos 5 anos, os concelhos indicados foram Tranco, Méda, Almeirim, Almodôvar, Benavente, Serpa, Ponte de Lima, Montalegre, Leiria, Viseu, Castro Verde e Coruche (Figura 7). O MV que observou “sinais cutâneos e infertilidade nos machos” referiu um total de 5 explorações, nos concelhos de Vila Velha de Ródão, Idanha-a-Nova e Castelo Branco. Em duas das explorações foram observados 1-2 animais com sinais clínicos e numa exploração 3-5 animais, não havendo dados relativamente às restantes duas explorações. Quanto aos últimos 5 anos, o MV indicou o concelho de Idanha-a-Nova (Figura 7).

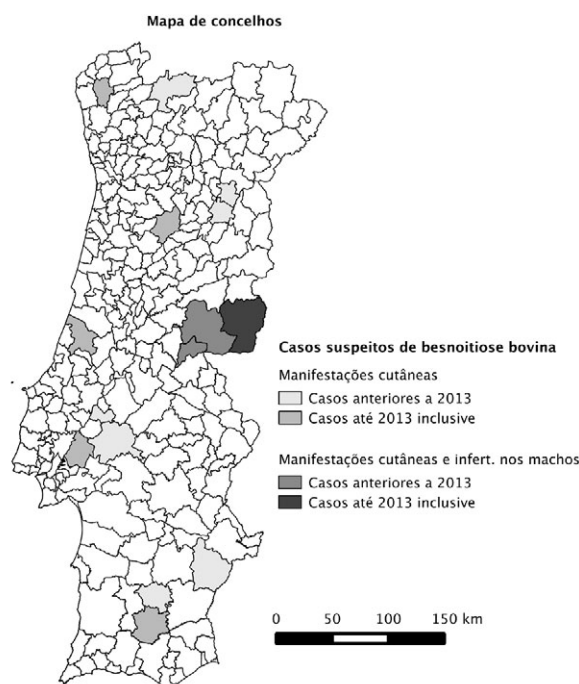


Figura 7 - Distribuição geográfica dos concelhos onde foram observados animais com sinais clínicos compatíveis com besnoitiose bovina.

Discussão

O presente estudo foi desenvolvido com dois objetivos principais. Por um lado, pretendeu-se avaliar a percepção da importância clínica e económica da besnoitiose bovina em Portugal e por outro sensibilizar para a sua inclusão no diagnóstico diferencial de outras afeções cutâneas, de modo a promover a sua deteção precoce, em especial nas regiões sem história de casos clínicos. Uma vez que para tal foi necessário envolver não só os médicos veterinários com experiência clínica, como também os colegas que embora informados nunca contactaram com a doença ou que a pudessem desconhecer, optámos por disponibilizar um questionário em duas partes, adaptadas aos diferentes graus de experiência com a doença.

As respostas obtidas permitiram uma boa cobertura geográfica de Portugal continental, com 16 distritos representados. No geral, a percentagem de MV com experiência clínica de besnoitiose bovina foi relativamente baixa (17,5%) e limitada à região do Alentejo. A distribuição geográfica dos diferentes graus de conhecimento da besnoitiose bovina mostrou que a experiência com esta doença é geograficamente influenciada, diminuindo com a distância ao Alentejo, sendo notório o facto de uma percentagem significativa dos MV na região Norte a desconhecer. Estes resultados eram esperados, uma vez que a informação prévia sobre a distribuição da doença, tanto os dados históricos, como os dados clínicos e serológicos apontava para a existência de um agregado espacial na região do Alentejo, fazen-

do prever que o número de MV com conhecimento e sobretudo com experiência clínica de besnoitiose bovina fosse maior nesta região, comparativamente ao resto do país. De facto, pelo questionário confirmámos que mais de metade dos inquiridos com atividade clínica no Alentejo já contactou com a doença. Além disso, os casos em 2013 foram diagnosticados exclusivamente no Alentejo, num total de 22 explorações, em 14 concelhos. Com exceção do concelho de Odemira, os concelhos indicados faziam parte do agregado espacial de explorações infetadas identificado anteriormente (Waap *et al.*, 2014). Por outro lado, para além da concentração dos casos na região do Alentejo, a baixa morbilidade geralmente atribuída (Pols, 1960) à doença e a fácil confusão com outras afeções cutâneas, poderão contribuir para que a besnoitiose bovina passe despercebida e inclusivamente continue a ser desconhecida em áreas não endémicas. A baixa morbilidade referida na literatura constatou-se também nas respostas ao questionário, não ultrapassando, no geral uma média de <1 a 4 explorações afetadas por ano. Nas explorações diagnosticadas em 2013, o número de animais com manifestações clínicas foi relativamente baixo, com apenas 1-2 casos em 65% das explorações e mais de 3 casos nas restantes. Quanto ao número de mortes, apenas 1-2 casos foram associados a *B. besnoiti* em três das explorações indicadas, o que está de acordo com a baixa mortalidade ($\leq 10\%$) da doença (Pols, 1960). Relativamente à sazonalidade dos casos clínicos, embora a incidência da besnoitiose bovina seja habitualmente associada aos meses do verão, devido a uma maior atividade dos insetos (Pols, 1960; Bigalke 1968; Jacquiet *et al.*, 2010; Álvarez-García *et al.*, 2013), o questionário revelou que os casos clínicos são detetados ao longo de todo o ano, embora com uma maior percentagem nos meses mais quentes de abril-junho (78,6%) e julho-setembro (71,4%), comparativamente aos trimestres outubro-dezembro e janeiro-março (50%). As ocorrências nos meses mais frios resultam possivelmente do diagnóstico tardio das infeções no final do verão, devido ao período de tempo necessário para o aparecimento dos sinais crónicos característicos, mas também à falta de alerta dos proprietários para esta doença. Por outro lado, a ocorrência de casos no Inverno, portanto num período de baixa atividade dos dípteros, foi também mencionada por Khvan (1969), o que sugere a hipótese de outros mecanismos de transmissão.

Embora os sinais clínicos agudos da besnoitiose bovina sejam geralmente referidos como inespecíficos e difíceis de detetar (Bigalke e Prozesky, 2004; Jacquiet *et al.*, 2010; Álvarez-García *et al.*, 2013), 42,9% dos inquiridos diagnosticaram os animais na fase aguda, o que mostra que parte dos clínicos está bem familiarizada com a doença e que é possível diagnosticá-la numa fase precoce. Na fase crónica, os sinais mais evidentes foram “espessamento das pregas da pele”, “alopecia”, “hiperqueratose” e “fissuras entre as pregas de pele”, observados por todos os MV. Não sendo a presença de

nenhum destes sinais patognomónico, o seu conjunto é fortemente sugestivo de besnoitiose bovina, especialmente em áreas endémicas, devendo esta ser incluída no diagnóstico diferencial das afeções cutâneas com um quadro clínico semelhante. Relativamente aos métodos de diagnóstico, metade dos clínicos baseou-se exclusivamente no diagnóstico clínico, dispensando a confirmação laboratorial. Se por um lado a confiança no diagnóstico clínico revela grande experiência, por outro lado, a ausência de confirmação por outros meios pode ter consequência graves no caso de erro de diagnóstico, incluindo o refugo desnecessário dos animais ou o agravamento das lesões, tendo em conta que a besnoitiose bovina não tem tratamento e várias outras afeções cutâneas são curáveis.

A maioria dos MV (71,4%) adotou uma ou mais medidas de prevenção, revelando conhecimento das medidas de combate à doença disponíveis. O “refugo dos animais doentes” foi considerado a medida mais eficaz, uma vez que foi implementada por todos, isoladamente ou em combinação com outras medidas, como o rastreio dos animais adquiridos, a separação dos animais infectados, o refugo animais serologicamente positivos e o reforço do tratamento insecticida, indo ao encontro das recomendações gerais para o combate e prevenção desta doença (Jacquiet *et al.*, 2010; Álvarez-García *et al.*, 2013). Embora o impacto da besnoitiose no sector da produção bovina na Europa ainda esteja por determinar (EFSA, 2010; Álvarez-García *et al.*, 2013), a sua importância económica ficou patente no questionário, na medida em que foi classificada entre média a alta pela maioria (71,4%) dos MV com experiência clínica.

A adesão ao questionário pelos MV sem experiência da doença foi boa e revelou um grande interesse pelos aspetos clínicos e epidemiológicos da besnoitiose bovina, considerando que 83% dos inquiridos nunca tinha contactado com a doença. Depois de consultarem a página com a descrição e imagens das principais manifestações clínicas, 16,7% dos MV informados, mas nenhum dos que desconheciam a doença admitiu a possibilidade de ter observado animais com sinais compatíveis com besnoitiose bovina no passado. Os casos referidos ocorreram sobretudo nos meses de verão, coincidindo com a sazonalidade característica da doença (Pols, 1960; Bigalke, 1968; Jacquiet *et al.*, 2010; Álvarez-García *et al.*, 2013). Estas observações são bastante interessantes, uma vez que no rastreio serológico tinham sido detetados animais serologicamente positivos em 6 dos 15 concelhos indicados pelos inquiridos (Montalegre, Trancoso, Idanha-a-Nova, Castelo Branco, Coruche e Benavente) (Waap *et al.*, 2014) e os primeiros casos clínicos a norte do rio Tejo, em Idanha-a-Nova e Castelo Branco, foram confirmados em 2014 (Meireles *et al.*, 2014). Estes dados mostram claramente que a divulgação de informação produziu uma maior sensibilização para a doença, aumentando a receptividade para a sua futura inclusão no diagnóstico diferencial.

No geral, o questionário revelou que a experiência clínica da besnoitiose bovina está concentrada na região do Alentejo e que, embora a larga maioria esteja informada sobre a doença, ainda existe um número significativo de MV que a desconhece. Dada a importância económica, reconhecida no questionário pelos que têm mais experiência com a besnoitiose bovina e os fortes indícios de que a infeção não está confinada ao Alentejo, é essencial divulgar o quadro clínico e os métodos de diagnóstico laboratorial disponíveis pelos médicos veterinários e produtores pecuários, como forma de sensibilizar e alertar para o diagnóstico precoce desta doença e evitar a sua disseminação.

Bibliografia

- Agosti M, Belloli A, Morini M, Vacirca, G (1994). Segnalazione di un focolaio di Besnoitiosi in bovini da carne importati. *Praxis*, 15, 5-6.
- Álvarez-García G, Frey CF, Mora LM, Schares G (2013). A century of bovine besnoitiosis: an unknown disease re-emerging in Europe. *Trends in Parasitology*, 29, 407-415.
- Alzieu JP, Dorchies P, Schelcher F, Gottstein B (2007). L'extension de la besnoitiose bovine en France. *Le Point Vétérinaire*, 276, 37-43.
- Beck R, Štoković I, Pleadin J (2013). Bovine besnoitiosis in Croatia 2nd [abstract]. In Vaz Y (Ed.), *Proceedings of the 2nd International meeting on apicomplexan parasites in farm animals*, Kus, adasi, Turkey, 31 October-2 November, p.64.
- Besnoit C e Robin V (1912). Sarcosporidiose cutanée chez une vache. *Revue Vétérinaire*, 37, 649-663.
- Bigalke RD (1968). New conception of the epidemiological features of bovine besnoitiosis as determined by laboratory investigations. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 35, 3-137.
- Bigalke RD e Prozesky L (2004). Besnoitiosis. In: *Infectious diseases of Livestock*. Editores: JAW Coetzer e RC Tustin. Oxford University Press (Cape Town), 351-359.
- Bourdeau PJ, Cesbron N, Alexandre F, Marchand AM, Desvaux JP, Douart A (2004). Outbreak of bovine besnoitiosis (*Besnoitia besnoiti*) in the west of France and its diagnosis by immunofluorescence assay. In: *Proceedings of the IX European Multicolloquium of Parasitology*, Valencia, Spain, 18-23 July 2004, pp. 459-460.
- Cortes H, Leitão A, Vidal R, Vila-Viçosa MJ, Ferreira ML, Caeiro V, Hjerpe CA (2005). Besnoitiosis in Bulls. *Veterinary Record*, 157, 262-264.
- Cortes HC, Reis Y, Waap H, Vidal R, Soares H, Marques I, Pereira da Fonseca I, Fazendeiro I, Ferreira ML, Caeiro V, Shkap V, Hemphill A, Leitão A (2006). Isolation of *Besnoitia besnoiti* from infected cattle in Portugal. *Veterinary Parasitology*, 141, 226-233.
- Cortes HC, Mueller N, Esposito M, Leitão A, Naguleswaran A, Hemphill A (2007). In vitro efficacy of nitro- and bromo-thiazolyl- salicylamide compounds (thiazolides) against *Besnoitia besnoiti* infection in vero cells. *Parasitology*, 134, 975-985.
- Diesing L, Heydorn AO, Matuschka FR, Bauer C, Pipano E, de Waal DT, Potgieter FT (1988). *Besnoitia besnoiti*: studies on the definitive host and experimental infections in cattle. *Parasitology Research*, 75, 114-117.
- EFSA (2010). Bovine besnoitiosis: an emerging disease in Europe. *European Food Safety Authority. EFSA Journal*, 8, 1499-1514.
- Ellis JT, Holmdahl OJ, Ryce C, Njenga, JM, Harper PA e Morrison DA (2000). Molecular phylogeny of *Besnoitia* and the genetic relationships among *Besnoitia* of cattle, wildebeest and goats. *Protist*, 151, 329-336.
- Fernández-García A, Risco-Castillo V, Pedraza-Díaz, S, Aguado-Martínez A, Alvarez-García G, Gómez-Bautista M, Collantes-Fernández E, Ortega-Mora LM (2009). First isolation of *Besnoitia besnoiti* from a chronically infected cow in Spain. *Journal of Parasitology*, 95, 474-476.
- Franco EE e Borges I (1915). Nota sobre a sarcosporidiose bovina. *Revista de Medicina Veterinária*, Ano XIV, 255-299.
- Gollnick NS, Gentile A, Schares G (2010). Diagnosis of bovine besnoitiosis in a bull born in Italy. *Veterinary Record*, 166, 599.
- Hornok S, Fedák A, Baska F, Hofmann-Lehmann R, Basso W (2014). Bovine besnoitiosis emerging in Central-Eastern Europe, Hungary. *Parasit Vectors*, 7, 20.
- Jacquet P, Liénard E, Franc M (2010). Bovine besnoitiosis: epidemiological and clinical aspects. *Veterinary Parasitology*, 174, 30-36.
- Juste RA, Cuervo LA, Marco JC, Oregui LM (1990). La besnoitiosis bovina: desconocida en España? *Medicina Veterinária*, 7, 613-618.
- Khvan MV (1969). *Besnoitia besnoiti* of cattle in Kazakhstan. *Prog. Protozool*, 3, 232-233.
- Lesser M, Braun U, Deplazes P, Gottstein B, Hilbe M, Basso W (2012). First cases of besnoitiosis in cattle in Switzerland. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, 154, 469-474.
- Malta M e Silva M (1991). Besnoitiose no Alentejo. "IV Jornadas de Medicina Veterinária". Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa, Janeiro 15, 1991.
- Mehlhorn H, Klimpel S, Schein E, Heydorn AO, Al-Quraishy S, Selmaier J (2009). Another African disease in Central Europe: Besnoitiosis of cattle. I. Light and electron microscopic study. *Parasitology Research*, 104, 861-868.
- Meireles J, Waap H, Lourenço T, Vaz Y, Peleteiro MC, Cortes HCE, Leitão, A (2014). Bovine besnoitiosis in the region Centro, Portugal. VI Congresso da Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias, 3-5 April 2014, INIAV, Oeiras, Portugal.
- Pols JW (1960). Studies on bovine besnoitiosis with special reference to the aetiology. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 28, 265-356.
- Schares G, Basso W, Majzoub M, Cortes HC, Rostaher A, Selmaier J, Hermanns W, Conraths FJ, Gollnick NS (2009). First in vitro isolation of *Besnoitia besnoiti* from chronically infected cattle in Germany. *Veterinary Parasitology*, 163, 315-322.
- Shkap V, Pipano E, Ungar-Waron H (1987). *Besnoitia besnoiti*: chemotherapeutic trials in vivo and in vitro. *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux*, 40, 259-264.
- Shkap V, Reske A, Pipano E, Fish L, Baszler T (2002). Immunological relationship between *Neospora caninum* and *Besnoitia besnoiti*. *Veterinary Parasitology*, 106, 35-43.
- Vanhoudt A, Pardon B, De Schutter P, Bosseler L, Sarre C, Verduyck J, Deprez P (2015). *Diergeneeskundig Tijdschrift*, 84, 205-209.
- Waap H, Nunes T, Cortes H, Leitão A, Vaz Y (2014). Prevalence and geographic distribution of *Besnoitia besnoiti* infection in cattle herds in Portugal. *Parasitology Research*, 113, 3703-3711.