



UNIVERSIDADE
E D U A R D O
MONDLANE

Faculdade De Veterinária

Departamento De Produção Animal

Curso De Licenciatura Em Medicina Veterinária

Trabalho De Culminação De Estudos

**Inoculação De Ball 3 como Método Adicional de Diagnóstico da Causa de
Mortalidade de Bovinos em Palmeira**

Autor:

Linda Da Graça Jeremias Chirrinze

Supervisor:

Prof. Doutor Rafael Escrivão

Maputo, Outubro de 2023

DECLARAÇÃO DE HONRA

Eu, Linda Da Graça Jeremias Chirrinze, declaro por minha honra que o presente trabalho com o título: **Inoculação de Ball 3 como Método Adicional de Diagnóstico da Causa de Mortalidade de Bovinos em Palmeira**”, é da minha autoria e nunca foi apresentado para outro propósito que não seja para a obtenção do grau de Licenciatura em Medicina Veterinária.

Maputo, ao 09 de Outubro de 2023

(Linda Da Graça Jeremias Chirrinze)

AGRADECIMENTOS

Ao único Deus e Salvador meu, aquEle que me sonda, e me conhece; aquEle que conhece o meu assentar e o meu levantar e de longe entende o meu pensamento, aquEle que cerca o meu andar e o meu deitar e conhece todos os meus caminhos eu agradeço de todo coração. Pois, se não fora o Senhor que esteve ao meu lado, as águas teriam transbordado sobre mim, e a corrente teria passado sobre a minha alma. A Glória e a Honra seja toda para ti meu Senhor.

Aos meus pais Jeremias Camela Chirrinze e Olinda Nomeado M. Chirrinze (em memória) pela inteira dedicação à minha formação espiritual, psicológica e académica, pelo papel impecável que eles exerceram honrando a Deus em suas palavras e acções, acima de tudo educando-me na sua doutrina e admoestação. Bem-haja.

Aos meus irmãos Jerson, Elizur, Loide e J. Júnior por terem sido a força motriz que precisava para jamais desistir.

A minha segunda mãe Maria Celeste Chirrinze por exercer este papel com inteira dedicação.

Ao meu amado noivo Matt De Figueiredo, pela constante motivação, apoio moral, e financeiro, por acreditar sempre em mim e exaltar as minhas capacidades, motivando-me dia e noite.

Ao meu Supervisor Prof. Doutor Rafael Escrivão, pela experiência teórica e prática concedida, pelos valores e preceitos ensinados, pela motivação e exortação sempre oportuna; por se tornar um modelo profissional particularmente admirável, e por despertar em mim um amor maior pela profissão de campo, pela investigação e por fim por ter-me assistido pacientemente na elaboração deste trabalho.

A exploração pecuária Inácio de Sousa Lda. pela oportunidade concedida, em especial ao Sr. Jeremias Timane por se dispor a ensinar-me tudo que foi possível durante o período de estadia, certamente me valerei disto em toda carreira profissional.

Aos meus amigos e colegas de batalha, Inácia Telma, Valério Mário e Cleyd Delitos sem a ajuda dos quais certamente não seria possível chegar até aqui.

À todos que de alguma forma auxiliaram-me, tornando possível a concretização deste trabalho.

DEDICATÓRIA

À Deus

Insecreta admiração

Te admiro insecretamente,

*Minhas atitudes, meu falar e meu embasbacar demonstram
claramente o que se desenrola em minha mente,
És tão incontestavelmente a maior de todas as minhas admirações,
És então a única razão de por meio destas letras
eu ter-lhe escrito esse aviltante e desprezioso texto,
Era então o desejo de minh'alma que em tão pouco pudesse
epitomar à cerca de sua importância para mim,*

Admiro-te insecretamente!!!

*Você é o único móbil do meu incólume permanecer neste vil deserto
Se não fora teu sustento teriam nalgum momento
as adversidades deste deserto sido o motivo do meu lânguido,
Ora então...*

É axiomática a minha afabilidade por ti ó Deus da minha vida.

Insecreta é a minha admiração!!!.

Autora: *Linda Chirrinze*

Aos meus pais

Jeremias e Olinda Chirrinze!

ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS

AGV	Ácidos gordos voláteis
CELISA	Ensaio imunoenzimático celular
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxiribonucléico
EB	Corpo elementar
Fig	Figura
IFA	Anticorpo Fluorescente Indireto
I.M	Intramuscular
I.S	Inácio de Sousa
I.V	Intravenosa
Kg	Quilograma
Mg	Miligrama
mL	Mililitro
Oxit	Oxitetraciclina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RB	Corpo reticular
SNC	Sistema Nervoso Central
%	Percentagem

LISTA DE FIGURAS

Figura I. Local de estudo: Inácio de Sousa Lda (Google Maps, 2023).....	16
Figura II. BALL 3 conservado e transportado em nitrogênio líquido. (fonte: autor)	18
Figura III. A. Regulação da temperatura da água até os 38 °C. B. Descongelamento do inóculo a 38 °C (fonte: autor).....	19
Figura IV. Inoculação endovenosa de BALL 3. (fonte: autor)	19
Figura V. Animal morto; Hidropericardio numa vaca (fonte: autora).	39
Figura VI. Sinais respiratorios (fonte: autora).	40
Figura VII. Hidrotorax e pulmões congestionados (edema-pulmomonar num ovino) (fonte: autora). .	40
Figura VIII. Resultados laboratoriais referentes as amostras provenientes de alguns animais mortos. Ano 2022	40
Figura IX. Resultados laboratoriais das amostras de 7 cérebros de animais tratados sem sucesso..	42
Figura X. Registo das temperaturas de inoculação- 2023.	42

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Percentagem das reacções resultantes da inoculação-2018.....	21
Tabela II. Resumo dos sinais clínicos apresentados pelos animais.....	23

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico IV. Distribuição cumulativa das reacções ao longo do experimento-2023.....	22
Gráfico V. Representação gráfica do percentual das inoculações (2018 e 2023).....	23

LISTA DE ANEXOS

Protocolo de inoculação de BALL 3.....	44
Figuras demonstrativas (necrópsia) dos sinais clínicos decorrentes da erlichiose.....	45
Resultados laboratoriais de amostras. Ano 2022.....	46
Resultados laboratoriais de amostras. Ano 2023.....	47
Registo da temperatura de inoculação (2023).....	47

ÍNDICE

2. INTRODUÇÃO.....	3
3. OBJECTIVOS	5
3.1-Geral	5
3.2-Específicos	5
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
4.1- História e taxonomia da erliquiose.....	6
4.2-Espécies susceptíveis.....	6
4.3- Epidemiologia.....	6
4.4- Ciclo biológico da <i>Erliquia ruminantium</i>	7
4.5- Transmissão.....	7
4.6- Período De Incubação	8
4.7- Fisiopatologia	8
4.8- Sinais clínicos.....	9
4.9- Achados <i>post-mortem</i>	9
4.10- Prevenção e controlo.....	10
4.10.2- Tratamento antibiótico.....	11
4.11- Mortalidade.....	12
4.12- Diagnóstico.....	12
4.13- Diagnóstico Definitivo	13
4.13.1- Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	13
4.14- Diagnóstico Diferencial.....	13
4.15-Tratamento	14
4.16- Imunidade.....	15
5. MATERIAL E MÉTODOS	16
5.1- Local do Estudo	16
5.2- História de erlichiose na exploração e Metodologia do estudo.....	16
5.3- Recolha de dados.....	17

Inoculação de BALL 3 como método adicional de diagnóstico da causa de mortalidade de bovinos em
palmeiras

6- INOCULAÇÃO	18
6.1-Seleção dos animais	18
6.2- Metodologia de inoculação e tratamento	20
6.3- Processamento e análise de dados.....	20
7. RESULTADOS	21
7.1-Estudo passivo.....	21
7.2- Inoculação – 2023	21
8. DISCUSSÃO	25
10. CONCLUSÃO	31
11. RECOMENDAÇÕES	32
12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIAS	33
13. ANEXOS.....	39

1. Resumo

A Erliquiose é uma doença causada pela bactéria *Ehrlichia ruminantium* e transmitida por carrças *Amblyomma* e é responsável por cerca de 80-90% das mortes em explorações pecuárias na África. A escassez de estudos realizados para avaliar a eficácia dos métodos de imunização em bovinos em particular o uso do inócuo (BALL 3) e as constantes mortes de animais em explorações bovinas tornam relevante a realização deste estudo. O estudo compreendeu a caracterização da exploração quanto à ocorrência da Erliquiose efectuado via avaliação retrospectiva de inoculações de Ball3 (2018 -2021), resultado de análises laboratoriais de cérebros e gânglios de animais mortos e a imunização de seis vitelos com recurso a Ball3 incluindo envio ao laboratório da DCA-IIAM de amostras de cérebro e gânglios de animais que morreram na exploração durante o estudo. Para a imunização dos seis (6) vitelos foi usado o método de infecção e tratamento individual, que consistiu na inoculação de BALL 3IV (veia jugular), seguida de termometrias por um período de 30 dias e posterior tratamento com Oxitetraciclina na dose de 10 mg/kg pv imediatamente após a reacção febril. Os resultados demonstraram uma resposta à inoculação em mais de 80% dos animais. Sinais clínicos, resultados laboratoriais, e reacções dos animais ao inóculo são um indicativo de ausência de imunidade. Com base nos resultados do estudo a Erliquiose é causa principal associada as mortes e caracteriza-se BALL3 como capaz de conferir imunidade.

Palavras-Chave: Bovinos, *ehrlichia ruminantium*, rickettsiose, BALL 3, imunidade, palmeira.

1. ABSTRACT

Ehrlichiosis is a disease caused by the bacterium *Ehrlichia ruminantium* and transmitted by *Amblyomma* ticks and is responsible for about 80-90% of deaths on livestock farms in Africa. The scarcity of studies carried out to evaluate the effectiveness of immunization methods in cattle in particular the use of BALL 3 and the constant deaths of animals on bovine farms make this study relevant. The study included the characterization of the exploration for the occurrence of Ehrlichiosis carried out via retrospective evaluation of Ball3 inoculations (2018 - 2021), the result of laboratory analysis of brains and ganglia of dead animals and the immunization of six calves using Ball3 including sending to the DCA-IIAM laboratory of brain and ganglia samples of animals that died in the exploration during the study. For the immunization of the six (6) calves, the method of infection and individual treatment was used, which consisted of the inoculation of BALL 3IV (jugular vein), followed by thermometries for a period of 30 days and subsequent treatment with Oxytetracycline at a dose of 10 mg/kg bw immediately after the febrile reaction. The results showed a response to inoculation in more than 80% of the animals. Clinical signs, laboratory results, and animal reactions to the inoculum are indicative of lack of immunity. Based on the results of the study, Ehrlichiosis is the main cause associated with deaths and BALL3 is characterized as capable of conferring immunity.

Keywords: Cattle, *ehrlichia ruminantium*, rickettsiose, BALL 3, immunity, palmeiras.

2. INTRODUÇÃO

A produção pecuária na África subsaariana é afectada por várias doenças. Segundo Madder *et al.* (2013) citado por Carvalho (2016) em África as doenças provocadas por protozoários, especialmente babesioses e teilerioses, e por rickettsias, anaplasmose e erliquiose, são os principais problemas de saúde de ruminantes domésticos. Por sua vez, Mukhebi *et al.* (1999) realçam dentre elas a Erliquiose como um grande obstáculo para a produtividade do gado doméstico em áreas onde é endêmica.

A *Ehrlichia ruminantium* afecta uma ampla gama de ruminantes, incluindo bovinos, ovinos, caprinos, várias espécies de antílopes e ruminantes selvagens (Nair *et al.*, 2021). A Erliquiose é transmitida por carraças gênero *Amblyomma* e as principais espécies na África Austral são *A. hebraeum* e *A. variegatum* (Horak *et al.*, 2018). A doença é particularmente grave quando os animais susceptíveis são movidos de áreas livres para áreas de risco (Simpson *et al.*, 1987).

Amblyomma hebraeum é uma carraça exclusiva da África Austral e ocorre nas regiões costeiras das províncias do Cabo e KwaZulu-Natal na África do Sul, bem como no sul de Moçambique (Jongejan *et al.*, 2020).

A infestação de carraças em bovinos pode levar à perda dos quartos do úbere, tornando as vacas incapazes de alimentar seus vitelos e prejudicando a produção de leite particularmente nas explorações leiteiras, em touros, a presença da carraça no escroto foi associada a infertilidade dos mesmos nas províncias do Noroeste da África do Sul (Jongejan *et al.*, 2020).

Em áreas de risco para Erliquiose, os proprietários de gado lidam com uma complexa interacção entre a própria infecção e o vector da doença; Além de ter que tratar casos clínicos, estes enfrentam uma batalha constante para prevenir a ocorrência da infecção e/ou tentar induzir um grau de imunidade de modo a reduzir os impactos clínicos adversos ou mortes em seus animais (Regional Activity to Promote Integration Through Dialogue and Policy Implementation [RAPID], 2001).

Uma abordagem para conferir imunidade, é a inoculação de BALL 3 nos animais. BALL 3 é uma preparação criopreservada do sangue de carneiro infectado por *Ehrlichia ruminantium*, produzida pelo Onderstepoort Biological Products e é usada para imunização de bovinos, ovinos e caprinos contra Erliquiose. Essa prática é incômoda pelas exigências de conservação, visto que, o mesmo deve ser mantido em nitrogênio líquido até ser injectado por via intravenosa. Após a inoculação, os animais devem ser monitorados até que apresentem aumento de temperatura, momento em que recebem antibióticos (oxitetracilina) para "bloquear" a doença, mas permitir o estabelecimento da imunidade (RAPID, 2001).

As crescentes mortes em explorações de gado bovino e pequenos ruminantes no distrito de Manhiça, e em particular na exploração alvo, com resultados laboratoriais que demonstram a circulação de *Erlíquia ruminantium*, evidenciam claramente que esta tem-se mostrado uma real ameaça biológica

Inoculação de BALL 3 como método adicional de diagnóstico da causa de mortalidade de bovinos em palmeiras

na área pecuária. Estudos realizados em pequenos ruminantes por Dumler *et al.* (2001); Asselbergs *et al.* (1993); Bekker *et al.* (2001) demonstraram que em Moçambique, a Erliquiose foi relatada em todo o País e principalmente durante a estação chuvosa o que coincide com as épocas de maior surto.

A situação que se tem enfrentando serve de impulso para a realização deste estudo, que tem como objectivo buscar evidências da causa de mortalidade em bovinos, medindo indirectamente o grau de imunidade e avaliar a capacidade de BALL 3 de produzir imunidade no gado bovino, de modo que, se possa adoptar a técnica de infecção e tratamento, como uma medida eficaz para enfrentar este que tem sido um obtáculo a nível de África e em particular em Moçambique.

É importante ressaltar que estudos anteriores em diversas regiões do continente tem mostrado que existe uma variedade de estirpes em isolados de *E. ruminantium* e em consequência disso existe uma variação nos níveis de resposta imunológica que podem ser obtidos da infecção pela estirpe em causa (BALL 3) daí que, espera-se que este estudo seja também, uma ferramenta motivacional a toda comunidade de Saúde Animal e Pública para procurar a adopção de mecanismos/medidas eficazes e aplicáveis à nossa realidade, para a redução das mortes que tem contribuído negativamente na produção animal no nosso País.

3. OBJECTIVOS

3.1-Geral

- Estudar a Erliquiose como causa de mortalidade de Bovinos na Palmeira- Manhiça

3.2-Específicos

- Caracterizar a exploração de estudo quanto a ocorrência de Erliquiose;
- Analizar a informação passiva dos registos da exploração no que se refere a inoculações de Ball 3;
- Imunizar animais e analisar os resultados da imunização com BALL 3;
- Abordar a técnica de infecção e tratamento como uma estratégia de imunização eficaz para *E. Ruminantium* em Moçambique.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1- História e taxonomia da erliquiose

A erliquiose é uma doença de ruminantes domésticos e selvagens (Walker e Olwag, 1987; Matos *et al.*, 2019); ela é transmitida por carrças do gênero *Amblyomma* (Mireille, 2023) e sua distribuição coincide com a de suas espécies vectoras, uma área que inclui toda a África Subsaariana (World Organisation for Animal Health [WOAH], 2002).

Esta doença teve o seu reconhecimento pela primeira vez na África do Sul (Bezuidenhout e Provost, 1987) no século XIX, onde foi determinada a sua transmissão por carrças em 1900, no entanto, o próprio microorganismo não foi demonstrado. Em 1925 o organismo causador da *Rickettsia* foi encontrado por Cowdry nos tecidos de animais infectados e em carrças, quando foi inicialmente denominada *Rickettsia ruminantium* (Dumler *et al.*, 2001; Allsopp, 2010; 2015). Em 1947, este organismo responsável pela doença foi nomeado *Cowdria ruminantium* (Babsola *et al.*, 2011; Allsopp, 2015), nome pelo qual ficou conhecido durante uma boa parte do século 20, estudos foram realizados e vários organismos da ordem foram reclassificados com base em evidências moleculares, levando a renomeação do organismo para *Ehrlichia ruminantium* em 2001 (Babsola *et al.*, 2011; Potential Worldwide Threats for Livestock [PWTL], 2018).

Com base em comparações de DNA ribossomal 16S e genes de operon de choque térmico groESL, *Ehrlichia ruminantium* foi classificada como pertencente à ordem *Rickettsiales* (Marcelino *et al.*, 2021) e à família *Anaplasmataceae* (Dumler *et al.*, 2001; Allsopp, 2015; OIE, 2021).

4.2-Espécies susceptíveis

E. ruminantium afecta bovinos, ovinos, caprinos e búfalos, podendo no entanto, haver variabilidade entre as espécies (Cambaza, 2007). As espécies silvestres que foram comprovadas como susceptíveis à infecção natural e/ou experimental incluem bonteboque (*Damaliscus pygargus*), gnus-de-cauda-branca e preta (*Connochaetes gnou* e *C. taurinus*), búfalo-africano (*Syncerus caffer*), elande (*Taurotragus oryx*), girafas (*Giraffa camelopardalis*), cudo (*Tragelaphus strepsiceros*), palanca-negra (*Hippotragus niger*), cobo-leche (*Kobus leche kafuensis*), punja (*Raphicerus campestris*), cabra-de-leque (*Antidorcas marsupialis*), sitatunga (*Tragelaphus spekii*) e o veado-de-cauda-branca (*Odocoileus virginianus*) (World Organisation for Animal Health [WOAH], 2002; Pfitzer, 2004; Allsopp, 2010; Spickler, 2015).

4.3- Epidemiologia

A presença da carrça *Amblyomma* é um factor determinante para a ocorrência da erliquiose e a interacção da triada (vector, agente causador e hospedeiro) é um factor do qual o estabelecimento da infecção depende (WOAH, 2002; Mapham e Vorster, 2017).

Allsopp (2010) acrescenta que a epidemiologia da erliquiose depende de muitas circunstâncias interactivas, e poucas destas são inteiramente quantificáveis. Factores importantes como: o número e susceptibilidade dos hospedeiros disponíveis; as populações e taxas de infecção das carraças; variações sazonais na abundância e actividade das carraças; disseminação de carraças infectadas e/ou animais portadores; e a características de diferentes estirpes do organismo causador.

4.4- Ciclo biológico da *Erlíquia ruminantium*

Erlíquia ruminantium desenvolve-se inicialmente nas células epiteliais do intestino das carraças e os estágios subsequentes nas células da glândula salivar e nas células reticuloendoteliais, ou células endoteliais dos vertebrados hospedeiros (Prozesky e Du Plessis, 1987; Marcelino *et al.*, (2012) citado por Cangí, 2017). Os estágios em que a transmissão para o hospedeiro final é alcançada parecem ser coordenados com o ciclo de alimentação das carraça e o hospedeiro vertebrado é infectado por meio das glândulas salivares da mesma (Prozesky e Du Plessis, 1987).

Nas células endoteliais, *E. ruminantium* apresenta um ciclo de desenvolvimento caracterizado por duas formas distintas, o corpo elementar (EB) e o corpo reticulado (RB). Os EBs são pequenos (0,2–0,5 µm de diâmetro), sendo as formas infecciosas extra-celulares livres da bactéria (Marcelino *et al.*, 2021).

Após a invasão celular, eles residem dentro de inclusões intracitoplasmáticas (chamadas mórulas), onde se convertem em corpos reticulados (RBs) intracelulares não infecciosos, metabolicamente activos, maiores (0,75–2,5 µm). Os RBs se multiplicam por fissão binária, preenchendo rapidamente a inclusão, que se expande de tamanho. RBs condensam novamente em EBs no final do ciclo, sendo liberados após a lise da célula hospedeira (Marcelino *et al.*, 2021). A ruptura dissemina centenas de corpos elementares na corrente sanguínea para continuar o ciclo de infecção (Prozesky e Du Plessis, 1987).

4.5- Transmissão

A *Erlíquia* pode ser transmitida por 12 espécies de *Amblyomma*. A importância destes vectores depende bastante da extensão de sua distribuição, adaptação às estirpes domésticas e sua eficácia como vectores (Bezuidenhout, 1987), assim sendo, das 12 espécies de *Amblyomma* conhecidas como capazes de transmitir *E.ruminantium*, a espécie *variegatum* é sem dúvida, a mais importante dentre elas, não apenas por ser um vector extremamente eficiente, mas também por ser muito mais amplamente distribuída quando comparada a qualquer uma das outras espécies (Walker,1987; PWTL, 2018).

Outras espécies vectoras importantes são *A. hebraeum* (no sul da África) e *A. lepidum* (na África Oriental e no Sudão) (PWTL, 2018).

As carraças são infectadas enquanto se alimentam de animais reactivos ou de hospedeiros infectados subclínicamente (Bezuidenhout, 1987) e a picada das fêmeas destes vectores é geralmente responsável por transmitir a bactéria aos animais (Daniel *et al.*, 2002); *Amblyoma* é uma carraça de três (3) hospedeiros (Kasari *et al.*, 2010; Merck, 2011) podendo ser os hospedeiros de cada está pertencentes a mesma espécie ou não, e o ciclo de vida da carraça pode levar de 5 meses ou até 4 anos até que se complete (Barré *et al.*, 1995; Kasari *et al.*, 2010). Por essas carraças serem infectadas como larvas ou ninfas e transmiti-las como ninfas ou adultos, a infecção pode persistir nelas por pelo menos 15 meses; não há transmissão transovariana. Pode ainda ser transmitida verticalmente e através do colostro de mães portadoras (Kasari *et al.*, 2010)

A transmissão também pode ocorrer experimentalmente por inoculação intravenosa de sangue infectado, homogeneizados de carraças ou material de cultura celular contendo *E. Ruminantium* (OIE, 2021).

4.6- Período De Incubação

O período de incubação varia de acordo com a espécie afectada, via de infecção, estirpe de *E.ruminantium*, tipo e quantidade de inóculo (Deem, 2008). Este período tem uma variação média de 2 a 3 semanas em infecções naturais (PWTL, 2018), mas pode variar de 10 dias à 1 mês. Em infecções experimentais (inoculação intravenosa de sangue) o Período de incubação é de 7 à 10 dias em ovinos e caprinos, e 10 à 16 dias em bovinos (WOAH, 2002). Em infecções experimentais outro factor do qual o P.I fortemente dependente, é a dose de infecção das formas extracelulares infecciosas da bactéria que são inoculados, daí que, nesses casos um estágio febril pode se desenvolver entre 2 e 10 dias após a transmissão, momento em que os organismos são localizados em células plasmáticas, neutrófilos e ocasionalmente em outros granulócitos (Mulinge, 1990; WOAH, 2002; Kasari *et al.*, 2010;).

4.7- Fisiopatologia

A fisiopatologia da Erliquiose é pouco compreendida; sabe-se porém, que a *E. ruminantium* parasita células endoteliais vasculares, neutrófilos e macrófagos de hospedeiros mamíferos (Deem, 2008).

São vários factores que têm sido descritos como possivelmente envolvidos na patogênese da erliquiose. Um deles é o aumento da permeabilidade vascular (que leva ao acúmulo de líquido em alguns tecidos e nas cavidades corporais) que tem grande importância no aparecimento das lesões patológicas macroscópicas e achados histológicos (Deem, 2008; Mulinge, 1990). No entanto, a causa do hidropericárdio e edema pulmonar é polémica, enquanto alguns atribuem o aparecimento do edema pulmonar à desregulação imunológica devido resposta do hospedeiro ao patógeno, a outra hipótese é que o edema pulmonar é principalmente neurogênico (PWTL, 2018).

Alguns autores têm associado a destruição dos capilares, e o aumento da permeabilidade à presença de toxina na bactéria, no entanto, não foi demonstrada ainda a presença da mesma (Mulinge, 1990). Substâncias vasoactivas (histamina e serotonina) também são sugeridas como causadoras de reacções de hipersensibilidade, podendo ser a base para a patogênese da erliquiose (Du Plessis *et al.*, 1987).

4.8- Sinais clínicos

O espectro da doença pode variar de subclínica (estado de portador), aguda (fase caracterizada por febre prolongada, tosse e leve incoordenação e recuperação), à hiperaguda (caracterizada por febre, lacrimejamento, convulsões e rápida progressão para morte) (PWTL, 2018; Deem, 2008). Os sinais clínicos são dramáticos nas formas hiperaguda e aguda, no entanto, a forma aguda é a mais comum (PWTL, 2018; Deem, 2008).

A forma subclínica também denominada como “febre da água do coração”, é observada em bovinos parcialmente imunes, em vitelos com menos de 4 semanas de idade, ou ainda em raças ou animais com alta resistência natural a doença; o único sinal clínico observado é a febre transitória (PWTL, 2018).

A forma aguda caracteriza-se por febre de 40°C ou mais, que geralmente permanece alta e cai abaixo da temperatura corporal normal pouco antes da morte (Mulinge, 1990). Outros sinais clínicos que os animais frequentemente apresentam são a anorexia e depressão, membranas mucosas congestionadas e friáveis. A tosse, a dispnéia desenvolve-se junto de sinais nervosos como hiperestesia, marcha rígida com passos galopantes, nistagmus e ranger de dentes. Na sua fase terminal, prostração com crises de opistótono, movimentos de pedalar, enrijecimento dos membros e convulsões são vistas (PWTL, 2018).

Allsopp *et al.* (2004); PWTL, (2018) referem ainda que alguns bovinos, particularmente os da raça Jersey e Guernsey, desenvolvem diarreia profusa, muitas vezes hemorrágica.

Na forma hiperaguda, os animais podem ser achados mortos poucas horas após desenvolverem febre, alguns destes animais não desenvolvem nenhum outro sinal clínico aparente; outros exibem dispnéia acentuada e/ou convulsões paroxísticas (OIE, 2021).

4.9- Achados *post-mortem*

Hidropericárdio (fig.I em anexos), de coloração acastanhada a avermelhada é um achado característico da erliquiose, o que leva a doença a ser conhecida também como “*água do coração-heartwater*” (Spickler, 2015). Outros achados *post-mortem* associados a infecção por *E. ruminantium* incluem hidrotórax (fig IV em anexos), edema pulmonar (fig.III em anexos), ascite, edema cerebral, edema dos gânglios linfáticos e esplenomegalia (Benzuidenhout, 1994; Deem, 2008; Roger *et al.*, 2011).

Congestão e/ou edema no trato gastrointestinal, podem também ser observadas, especialmente na mucosa abomasal. Petéquias subendocárdicas são comuns, hemorragias submucosas e subserosas também podem ser vistas em outros órgãos. Esplenomegalia tem sido observada em muitos animais (Mulinge, 1990). Congestão e edema nas meninges às vezes são encontrados no cérebro; no entanto, as lesões são geralmente sutis ou ausentes no SNC (Mulinge, 1990; Deem, 2008; Spickler, 2015).

4.10- Prevenção e controlo

Actualmente, a imunização consiste em infectar os animais com um inóculo comercial que contém a bactéria, moderadamente virulenta, estirpe de *E. ruminantium*, e tratando os animais com oxitetraciclina após um aumento de temperatura (Spickler, 2015; Allsop 2015; PWTL, 2018).

É geralmente aceite que os vitelos até às 3 semanas de idade têm um elevado grau de resistência natural (Uilenberg, 1981; Prozesky, 1987), daí que, se o objectivo fôr apenas infectar e dispensar o tratamento, a outra alternativa é a inoculação em vitelos durante o primeiro mês de vida. Pela sua resistência à erliquiose estes animais jovens geralmente não requerem tratamento no entanto, animais mais valiosos ainda podem precisar e devem ser monitorados. Por haver várias estirpes circulantes no campo a duração e eficácia da imunidade a estirpes heterólogas são altamente variáveis; porém os animais inoculados e que respondem positivamente ao tratamento, desenvolvem uma imunidade sólida e por longos períodos a estirpes homólogas (Spickler, 2015; PWTL, 2018), salienta-se ainda que a "revacinação" é arriscada devido a possibilidade de reacções anafiláticas (Spickler, 2015).

Allsop (2015) concorda que a imunização é de facto, o método de controle mais amplamente utilizado na África Austral, mas refere que, embora o inóculo seja vendido como uma vacina, na realidade é um preparação criopreservada de sangue de ovelha contendo organismos infecciosos virulentos de *E. ruminantium* estirpe Ball 3.

Existem vários problemas com este procedimento. Primeiro as condições nas quais o inóculo deve ser mantido, sendo estas a uma temperatura bem abaixo de zero até imediatamente antes do uso porque as bactérias rapidamente perdem a infecciosidade uma vez descongelados, este facto pode se tornar um problema em áreas rurais. Em seguida, tal como acontece com todas as vacinas vivas, o procedimento só pode ser usado em áreas onde a doença é endêmica. Por último, todo o procedimento requer supervisão por equipe treinada para administrar a preparação por via intravenosa e realizar monitoramento subsequente (Allsop, 2015).

Outros métodos que são empregues no controlo e prevenção da erliquiose são descritos a seguir:

- **4.10.1-Controle de carraças**

O uso de acaricidas para o controle de carraças requer uma boa gestão para ter sucesso. É necessário que esta prática seja empregue de tal forma que seja mantida a estabilidade endêmica dentro das manadas, de tal forma que animais jovens sejam expostos levando ao desenvolvimento de imunidade por parte dos mesmos e do mesmo modo esta seja mantida nos membros adultos da manada.

O controle do vector quando feito de forma intensiva, leva a ausência completa de carraças nos animais, o que elimina o efeito do reforço imunitário, fazendo com que os animais das áreas em que a doença é controlada, fiquem sem imunidade natural à mesma; simultaneamente, as falhas na gestão levam ao aumento repentino da população de carraças o que acarreta perdas de animais por erliquiose e/ou outras doenças transmitidas por estes vectores (Bezuidenhout *et al.*, 1987; Allsop, 2015; Spickler 2015). Outro ponto que se deve tomar em consideração nesta prática, é a possibilidade de desenvolvimento de resistência das carraças aos acaricidas (Allsop, 2015).

- **4.10.2- Tratamento antibiótico**

A oxitetraciclina de acção prolongada é amplamente utilizada como tratamento profilático, consistindo em uma série de injeções intramusculares deste antibiótico quando os animais são introduzidos em uma área endêmica, para actuar como protecção enquanto permite que os mesmos desenvolvam alguma imunidade natural (Allsop, 2015).

O seu uso consiste em:

- i. Administrar oxitetraciclina (I.M) 3 vezes com intervalo de 7 dias entre as aplicações;

Purnell (1987) em seu estudo "*Development of a prophylactic regime using terramycin/la to assist in the introduction of susceptible cattle into heartwater endemic areas of Africa*" descreve o uso deste regime profilático, para imunização de novilhos transportados de uma exploração livre para uma exploração pecuária experimental onde a erliquiose era endêmica. O estudo consistiu em aplicar 20mg/kg de oxitetraciclina (I.M) num grupo de animais e tendo outro grupo como controle, seguida de exposição dos animais a carraças infectadas por um período de 7 dias, ciclo este que se repete até que estejam completas as 3 aplicações.

No estudo o autor descreve que além dos episódios febris intermitentes que foram observados nenhum outro sintoma compatível com a erliquiose foi detectado durante todo período de observação. Foi descrito no grupo controle o desenvolvimento da doença alguns dias após (entre os 14 e 29) a chegada dos animais nas áreas de risco e posterior morte de alguns deles apesar do tratamento efectuado.

Situações de campo que justificam o uso da oxitetraciclina para a profilaxia

- i. Submissão de animais jovens a infestações por *Amblyoma* após época de chuvas (Purnell,1984);
- ii. Introdução de animais susceptíveis em áreas de risco (Purnell,1984);
Mapham e Vorster (2017) descrevem este método profilático como prático e razoavelmente seguro para a introdução de grandes grupos de animais em áreas endêmicas.

Problemáticas associadas ao uso de antibióticos como método profilático

- i. É imprescindível a exposição dos animais ao agente patogénico nas primeiras quatro semanas após a administração do antibiótico, o contrário impossibilita o desenvolvimento de imunidade, daí que melhores resultados no uso deste método são adquiridos em áreas de alta endemicidade a erliquiose (Purnell, 1987; Mulinge, 1990);
- ii. Diferenças sazonais nas estipes de carraças e/ou de *E.ruminantium* erliquiose nas diferentes épocas do ano podem ser observadas, e em consequência disso a imunidade dos animais pode ser igualmente distinta durante as épocas do ano (Purnell, 1987);
- iii. Esta é uma opção muito cara, devido ao custo do medicamento em si e o custo logístico em grandes manadas; além do mais, parece inevitável que a resistência aos antibióticos eventualmente se desenvolva. A toxicidade no local da injeção é um problema que pode também estar associado ao uso prolongado de antibióticos nos animais (Peregrine, 1994; Allsop, 2009; 2015).

4.11- Mortalidade

Erliquiose impõe um alto custo económico para as indústrias pecuárias, uma vez que induz alta mortalidade, podendo esta ser de até 80-90% em animais susceptíveis (Spickler, 2015; Biguezoton *et al.*, 2016).

4.12- Diagnóstico

Um dos maiores desafios para a pesquisa e controle da erliquiose tem sido a falta de um teste de diagnóstico ante-mortem confiável e de fácil execução (Deem, 2008). Geralmente a presença de sinais clínicos consistentes com erliquiose como a febre, distúrbios respiratórios e morte súbita associados a presença da carraça *Amblyomma* são usados como diagnóstico de campo; (Roger *et al.*, 2011; PWTL, 2018).

Devido a predilecção de *E. ruminantium* por células endoteliais, estes organismos não podem ser detectados em esfregaços de sangue relacionada a uma parasitemia limitada, portanto, o único teste ante-mortem disponível até então, é a biópsia cerebral, em que posteriormente o organismo é

detectado em esfregaços de cérebro nas células endoteliais da camada íntima dos vasos (Deem, 2008).

4.13- Diagnóstico Definitivo

O diagnóstico definitivo pode ser obtido por esfregaços cerebrais que mostram os organismos nas células endoteliais com coloração positiva com corante Giemsa. Além do cérebro, os organismos podem ser identificados por microscopia de luz no tecido renal, pulmonar e cardíaco (Deem, 2008).

O teste de Anticorpo Fluorescente Indireto (IFA) tem sido extensivamente usado para detecção de anticorpos para Erliquiose, e o mais recente ensaio imunoenzimático competitivo (CELISA) promete ser uma adição útil à escassa gama de testes disponíveis para a detecção de anticorpos. As reacções cruzadas descritas entre as várias *Ehrlichia spp.* agora podem ser eliminados com o uso de antígenos mais específicos e anticorpos monoclonais (PWTL, 2018).

4.13.1- Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Apesar do diagnóstico definitivo da erliquiose ser obtido pelo exame de capilares em esfregaços cerebrais, Anifowose *et al.* (2020) descreve esse como não sendo um método adequado para estudos epidemiológicos em larga escala, descrevendo o método de ensaio baseado em PCR como mais sensível para detecção de *E.ruminantium*; os protocolos de PCR usados actualmente para detectar *E.ruminantium* levam tempo até que sejam concluídos, daí que o PCR em tempo real é uma alternativa para contornar este obstáculo (Steyn *et al.*, 2008; Cangi *et al.*, 2017). Este ensaio detecta o microorganismo em amostras de sangue bem como em carraças (Steyn *et al.*, 2008; OIE, 2018), o mesmo é baseado na região conservada do gene pCS20 de *E. ruminantium* que contém dois genes sobrepostos, rnc e ctaG. No seu estudo “*A quantitative real-time PCR assay for Ehrlichia ruminantium using pCS20*” refere que tanto o PCR quanto o PCR em tempo real detectam a *E.ruminantium* apenas em sangue colhido durante o período febril (Steyn *et al.*, 2008). Este é um teste eficaz para vigilância epidemiológica e monitoramento de animais infectados (Steyn *et al.*, 2008).

4.14- Diagnóstico Diferencial

Nos animais infectados, a Erliquiose pode resultar em diversos sinais clínicos, daí que os diagnósticos diferenciais para esta doença são numerosos; é necessário também incluir qualquer doença que cause sinais gastrointestinais e neurológicos ou morte aguda em ruminantes (Deem, 2008; Roger *et al.*, 2011).

A forma hiperaguda da doença pode ser confundida com anthrax; A forma aguda pode assemelhar-se a raiva, tétano, meningite bacteriana ou encefalite, enterotoxemia (*C. perfringens*) babesiose, anaplasmose, tripanossomiase cerebral ou teileriose. É importante que se inclua no diagnóstico, o envenenamento com estricnina, chumbo, ionóforos e outras toxinas miocárdicas, organofosforados,

arsênico, hidrocarbonetos clorados ou algumas plantas venenosas. Acúmulos de fluidos semelhantes aos observados à água do coração (erliquiose) podem também ser vistos em infestações graves de helmintos como a hemonose (Benzuidenhout et al., 1994; Roger *et al.*, 2011; OIE, 2021).

4.15-Tratamento

As tetraciclina a 10 mg/kg de peso corporal são eficazes no estágio inicial da doença. Em ovinos, caprinos e nas raças susceptíveis de bovinos ou em circunstâncias em que o tratamento não é realizado logo no início da reação febril, pode-se exigir um nível mais alto de tratamento (10 a 20 mg/kg). Nesses casos, o primeiro tratamento deve ser preferencialmente administrado lentamente por via IV. Por um período mínimo de três dias deve ser administrado independentemente da temperatura; se a febre persistir, o tratamento com oxitetraciclina deve continuar por um quarto e quinto dia. Se a febre ainda não diminuir, uma sulfonamida potencializada a 15 mg/kg/dia, IM, foi bem-sucedida em alguns estudos (Spickler, 2015). Spickler (2015) afirma ainda que apesar de as sulfonamidas terem atividade contra *E. ruminantium* são menos eficazes e que o tratamento de suporte (fluidos e suporte nutricional) pode ser necessário.

Em casos de ocorrência de edema cerebral, o tratamento é necessário, para este efeito os corticosteróides têm sido usados como terapia de suporte (prednisolona 1 mg/kg, IM), embora haja debate quanto à eficácia e justificativa para seu uso. Bezuidenhout (1982) citado por Van Amstel e Oberem (1997) faz referência a outros agentes que podem ser empregados a este respeito, incluindo diuréticos, e outros agentes anti-inflamatórios por exemplo anti-inflamatórios não esteróides e dimetil sulfóxido (DMSO).

Os diuréticos não osmóticos em particular a furosemida e os diuréticos osmóticos (manitol), são geralmente recomendados como tratamento de suporte nos estágios avançados. No entanto, devido aos efeitos que podem advir do uso dessas drogas, como o caso da inibição do cloreto e reabsorção de sódio no ramo ascendente do alça de Henle (Mudge, 1980 citado por Van Amstel e Oberem, 1997) resultando em excreção de um volume acompanhante de água causada pela furosemida deve se tomar especial atenção (Shakespeare *et al.*, 1998).

Estase ruminal é um sinal pouco relatado mas que muitas vezes é observado em animais com erliquiose. Os animais sofrem de indigestão e acidose ruminal, na qual a acidez ruminal cai para menos de 5, e leva à morte dos protozoários ruminais, uma queda acentuada na produtividade animal, na ruminação, na alimentação e impactação com acidez do sangue, expondo o animal à morte ainda que realizados os tratamentos anteriores e isto acarreta grandes perdas; optar pela transfaunação após o tratamento principal da erliquiose leva a uma recuperação mais rápida, melhor digestão e produção normal (Galbat e Keshta, 2020).

Inoculação de BALL 3 como método adicional de diagnóstico da causa de mortalidade de bovinos em palmeiras

Rumix¹ visa restaurar a função ruminal normal. Ao restaurar a função normal, os movimentos ruminais são reestabelecidos, a digestão é regulada, o apetite melhorado e a conversão alimentar promovida.

A transfaunação, que é a transferência de um certo volume de conteúdo ruminal de um animal sadio para um receptor enfermo, é um procedimento utilizado de forma corriqueira para o tratamento dos ruminantes (Priscilla *et al.*, 2018); Acredita-se que esta técnica estimule a função ruminal daí o seu uso como tratamento de suporte para cetose, anorexia e várias causas de indigestão (Steiner *et al.*, 2019).

É aconselhável administrar um complexo vitamínico B para promover a recuperação do sistema nervoso e estimular o apetite (Rensburg, 2017).

4.16- Imunidade

Animais recuperados de uma infecção natural ou artificial da erliquiose tornam-se solidamente imunes por um período variável de 6 a 18 meses na ausência de reinfecção, outrossim, a reinfecção durante este período de resistência confere um reforço na imunidade e estes assim permanecem enquanto forem periodicamente reinfecados (Du Plessis e Bezuidenhout, 1979; PWTL, 2018).

¹ **Composição:** propionato de Sódio 15% m/m; Produtos de Melão 47,5% m/m

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1- Local do Estudo

O presente estudo foi realizado na exploração pecuária Inácio de Sousa Lda, na localidade de Palmeira, distrito da Manhiça (figura I).

O distrito de **Manhiça** tem uma superfície de 2 380 km² está situado na parte norte da província de Maputo, em Moçambique. Tem limites geográficos, a norte e nordeste com o distrito de Bilene-Macia da província de Gaza, a leste com o Oceano Índico, a sul com o distrito de Marracuene, a oeste com o distrito de Moamba e a oeste e nordeste com o distrito de Magude. **Palmeira**, cujo nome formal é **Nwamantbjana**, é uma povoação moçambicana do distrito da Manhiça, província de Maputo, situada na estrada nacional N1, 100 km a norte de Maputo.

A exploração pecuária caracteriza-se pela criação de bovinos da raça Jersey com propósito de leite no sistema semi-intensivo, com um efectivo de 800 na altura da realização do estudo.

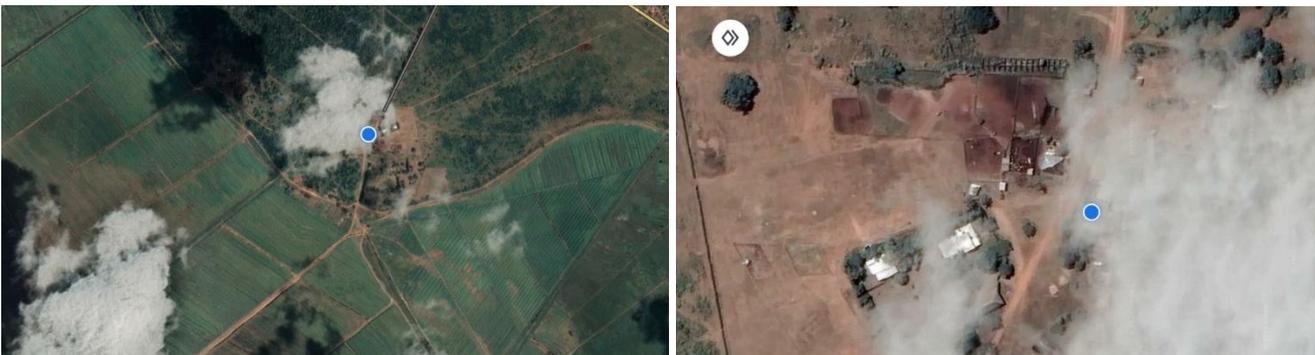


Figura I. Local de estudo: *Inácio de Sousa Lda* (Google Maps, 2023).

5.2- História de erlichiose na exploração e Metodologia do estudo

Nos pretéritos anos 2018, 2019 e 2022 bovinos da exploração I.S foram inoculados com Ball 3 para conferir imunidade contra a erlichiose, com intuito de reduzir as mortalidades que se tornavam crescentes principalmente após períodos de chuvas; À necrópsia, os animais apresentavam sinais compatíveis com a erliquiose (hidropericárdio, hidrotórax e congestão de órgãos como pulmão e fígado), e os resultados laboratoriais (ano 2022 documento em anexos), de esfregaços das amostras de cérebro e linfonodos demonstravam a presença de *Erlíchia ruminantium*.

Após o período de chuvas (Jan-Fev) que se atravessou no ano corrente, mortes massivas, de bovinos e alguns pequenos ruminantes (ovinos) ocorreram na exploração, igualmente aos anos posteriores, à necrópsia estes animais apresentavam sinais como: congestão pulmonar, hidrotórax, hidropericárdio (figuras em anexos). Destes animais, 7 cérebros (pág. 57 em anexos) devidamente acondicionados, foram transportados para o Laboratório Central de Veterinária onde 3 deles foram

Inoculação de BALL 3 como método adicional de diagnóstico da causa de mortalidade de bovinos em palmeiras

positivos a *Ehrlichia ruminantium* ao exame de esfregaço de cérebro, nos restantes não foi possível a detecção do agente causador da morte pois encontravam-se em estado avançado de autólise.

Os animais que morreram nos meses anteriormente mencionados foram submetidos ao tratamento para erliquiose e aparentemente recuperavam, no entanto, poucos dias depois caíam mortos. À necrópsia, o rúmem apresentava-se impactado (denotando ausência de actividade ruminal), e embora não mais apresentassem os sinais que levaram ao tratamento, os animais morriam por atonia ruminal.

Casos clínicos semelhantes aos observados na exploração de estudo foram verificados em outras explorações em Xinavane; em conversas informais com alguns profissionais veterinários relataram a ocorrência de Ehrlichia (laboratorialmente testado) em algumas explorações do distrito da Manhiça no mesmo período.

5.3- Recolha de dados

O estudo foi dividido em duas partes, sendo elas estudo passivo e activo. O estudo passivo consistiu na recolha dos dados da temperatura das inoculações feitas entre os anos (2018-2021), associados a aplicação de questionários semi-estruturados, com posterior informatização em excel para permitir a análise dos mesmos. O estudo activo consistiu na inoculação de BALL 3 em vitelos no ano 2023.

6- INOCULAÇÃO

6.1-Seleccção dos animais

Para a selecção da amostra foi usado o critério de amostragem por conveniência. Onde todos animais (vitelos) disponíveis na altura do estudo e não inoculados anteriormente foram submetidos à inoculação. Com efeito foram incorporados para o estudo 6 vitelos devidamente identificados nos quais, foi feita a inoculação endovenosa de sangue de ovino infectado por *Ehrliquia ruminantium*, estirpe BALL 3.

Identificação dos animais

Raça: Jersey

Idade: ≥ 4 meses

Números: 53; 51; 50; 49; 47; 46.

A inoculação foi feita no dia 26 de Abril de 2023 (dia zero do experimento) usando o protocolo de descongelamento rápido.



Figura II. BALL 3 conservado e transportado em nitrogênio líquido. (fonte: autora)

Inoculação de BALL 3 como método adicional de diagnóstico da causa de mortalidade de bovinos em palmeiras

Procedeu-se a regulação da temperatura da água de modo que a mesma estivesse à 38 °C; garantida a conecção dos animais procedeu-se ao descongelamento de um frasco por vez (contendo 3 doses) de BALL 3, no qual agitação suave do mesmo reduziu o tempo de descongelamento para 4-6 minutos.



Figura III. A. Regulação da temperatura da água até os 38 °C. B. Descongelamento do inóculo a 38 °C (fonte: autora).

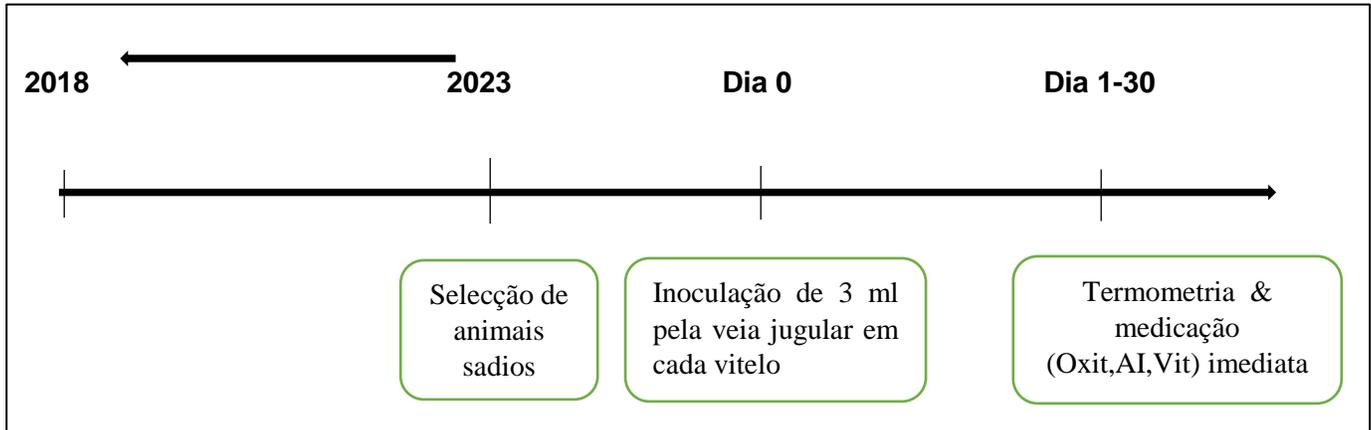
Descongelada totalmente a preparação, procedeu-se a inoculação de 3 ml da mesma em cada vitelo, pela via endovenosa-lenta (veia jugular).



Figura IV. Inoculação endovenosa de BALL 3. (fonte: autora)

6.2- Metodologia de inoculação e tratamento

O diagrama que se apresenta, faz referência aos experimentos e etapas da inoculação da *Ehrlichia* na exploração;



O *Dia 0* correspondente a 26 de Abril de 2023; **Oxit**-oxitetraciclina, **AI**-antiinflamatório, e **Vit**-vitamina.

Em todos animais submetidos à inoculação procedeu-se a:

- Aferição das temperaturas rectais dos animais desde o dia 1º pós inoculação até o 30º dia que foi o último dia de observação.
- Tratamento dos animais com oxitetraciclina na dose de 10 mg/kg (I.V) imediatamente após a elevação da temperatura ($\geq 39,6$ ° C), associado a diclofenac na dose de 2,5 mg/kg (I.M) e vitamina complexo B² 5 ml/100kg (I.M).

6.3- Processamento e análise de dados

Tanto os dados passivos assim como os activos, colectados e introduzidos no excel foram analisados através do método estatístico descritivo, para organizar, resumir e descrever os aspectos como: a percentagem de reacção à inoculação e período de tempo em que os animais permaneceram febris, estas características foram observadas e comparadas entre os grupos inoculados em todos anos do experimento.

² Cada ml contém: Vit B1-20 mg; Vit B2-5 mg; Vit B6-5 mg; Vit B12-5 µg; Nicotinamida-25 mg; Dexpantheno-6mg

7. RESULTADOS

7.1-Estudo passivo

Foram imunizados um total de 86 vitelos no ano de 2018, tendo sido 70 no primeiro semestre e 16 no segundo semestre. No primeiro semestre houve uma reacção febril de 39 animais o equivalente a 56% e no segundo semestre uma reacção de 15 animais totalizando 93,7%. Não foram observadas mortes durante o período experimental e em todos animais inoculados nenhuma doença e/ou sinais clínicos compatíveis com erlichia foram registados em 12 meses subsequentes a inoculação.

A tabela 1 mostra a relação entre os dias de inoculação e a quantidade de animais que reagiram (cumulativamente) até o último dia do experimento; esta relação foi posteriormente usada para comparar as percentagens obtidas em cada uma das fases de inoculação dentro da exploração.

Tabela I. Percentagem das reacções resultantes da inoculação-2018

Ano de inoculação	Animais inoculados	Animais que reagiram a inoculação	Percentagem de reacção
1° Semestre 2018	70	39	56%
2° Semestre 2018	16	15	93,7%
Total		86	

Dos animais mortos em 2022, 4 amostras de cérebro e gânglios linfáticos foram enviadas para o Laboratório Central, onde todos cérebros foram positivos a *E. Ruminantium*, para os gânglios linfáticos foi demonstrada a presença de *Theileria parva* em 3 deles. A morte destes animais foi associada a *Theileriose* em concomitância com *E. ruminantium*. (resultado em anexos). Importa referir que estes animais não foram encontrados nos registos dos animais submetidos as inoculações realizadas nos anos 2018 e 2019.

7.2- Inoculação – 2023

Os dados das temperaturas rectais de todos animais inoculados, eram registados, informatizados, convertidos gráficamente e posteriormente submetidos a análise.

O gráfico 3 faz relação entre os dias de inoculação e a quantidade de animais que reagiram durante todo período; esta relação foi posteriormente usada para avaliar as reacções obtida do experimento.

O gráfico 4 demonstra os resultados percentuais obtidos e compara-os aos resultados do ano 2018.

Inoculação de BALL 3 como método adicional de diagnóstico da causa de mortalidade de bovinos em palmeiras

Gráfico I. Distribuição cumulativa das reacções ao longo do experimento-2023.



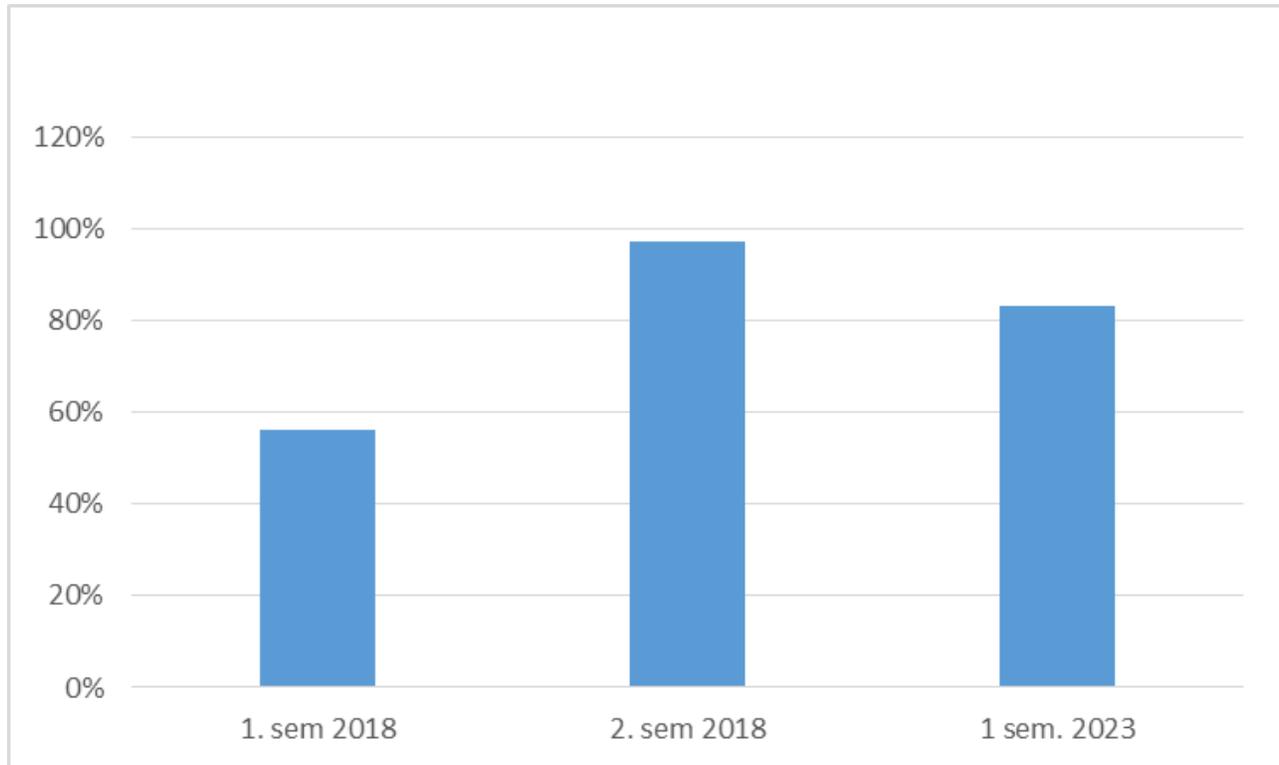
O período de incubação variou de 2 à 10 dias pós-inoculação, quando a piréxia foi registrada pela primeira vez; e as temperaturas apresentadas pelos animais variaram de 39,6°C e 40,6°C. As reacções de temperatura foram de 83,3%; O tratamento instituído em todos animais foi de, oxitetraciclina IV (10%) na dose de 10mg/kg ; diclofenac IM na dose de 2,5mg/kg e vitaminas do complexo B IM 5ml/por animal; este tratamento era realizado por um período de 3 dias seguidos e os resultados obtidos foram satisfatórios.

Não foi registada morte entre os animais durante todo período de observação.

O gráfico abaixo mostra as percentagens de reacção obtidas nas 3 fases; tendo sido, 56,2%, 93,7% e 83,3% para o primeiro e segundo semestre de 2018 e para o ano 2023 respectivamente.

Inoculação de BALL 3 como método adicional de diagnóstico da causa de mortalidade de bovinos em palmeiras

Gráfico II. Representação gráfica do percentual das inoculações (2018 e 2023).



Importa ressaltar que o gráfico apenas faz alusão da reação de temperatura dos animais, nele não são levados em consideração outros tipos de reações, excluindo qualquer animal que não tenha apresentado uma reação febril.

No ano 2023, o animal V.46 não apresentou elevação da temperatura ($\geq 39,6^{\circ}\text{C}$), no entanto, o mesmo apresentou outros sinais como tosse, dispnéia, inapetência e foi submetido ao mesmo tratamento e houve sucesso.

Tabela II. Resumo dos sinais clínicos apresentados pelos animais.

Nº do animal	Forma da doença	Sinais Clínicos	Período de incubação (dias)	T ^a máx (° C)	Duração do período febril (dias)	Observações
53/23	A	Febre, Inapetência, apatia.	4	40.2	1	Recuperado
51/23	A	Febre,				Recuperado

Inoculação de BALL 3 como método adicional de diagnóstico da causa de mortalidade de bovinos em palmeiras

		Inapetência, apatia.	7	40.2	3	
50/23	A	Febre, Diarréia, apatia, Inapetência	4	40.6	2	Recuperado
49/23	A	Febre, Inapetência	7	40	4	Recuperado
47/23	A	Febre, Inapetência	2	40.1	4	Recuperado
46/23	S	Tosse, Dispneia, Inapetência	10	39.5	0	Recuperado

A – Aguda; S – Subagudo; T^a máx (° C) - Temperatura máxima em graus celsius.

8. DISCUSSÃO

Feita a recolha dos dados passivos, e inoculação de Ball 3 em vitelos, importa discutir os dados da pesquisa que dizem respeito ao uso do inóculo como uma alternativa de diagnóstico da causa de mortalidade na exploração alvo, assim como verificar indirectamente a capacidade do mesmo de conferir imunidade nos bovinos.

No que diz respeito aos dados passivos da inoculação, as percentagens de reacção de temperatura no grupo inoculado em 2018 (primeiro e segundo semestre) foram de 56% e 93,7% respectivamente. No segundo semestre, grande parte dos animais expostos desenvolveu sinais comparativamente aos do primeiro semestre, no entanto, existe uma diferença enorme na quantidade de animais expostos em cada grupo, visto que o número exposto no primeiro semestre foi 4 vezes maior que o exposto no segundo semestre. Por outro lado, isso pode demonstrar fraqueza no monitoramento desses grupos após a inoculação, como a falha no registo das termometrias diárias, não significando que não houve nenhum sinal clínico decorrente da inoculação, mas sim, falhas no registo contribuindo para a exclusão de alguns animais do grupo dos reactivos no primeiro semestre. Para além de que durante conversas informais com o técnico responsável, foi mencionado que todos animais expostos na altura foram submetidos ao tratamento individual, significando desta forma que houve algum tipo de reacção e em consequência uma percentagem maior, este facto serviu para a redobrada atenção neste estudo.

A baixa percentagem de reacção observada no primeiro semestre pode ser explicada pela quantidade menor de animais inoculados (comparativamente ao primeiro semestre), no entanto, é notória a reacção de mais da metade do grupo.

A história da exploração demonstrou a ocorrência da erliquiose confirmada clínica e laboratorialmente; Foi observado alguns tratamentos realizados sem sucesso (ausência de febre, apetite, mobilidade normal) os animais morriam no final da primeira semana. À necropsia de campo apontou para impactação do rúmem, pré-estômagos preenchidos por conteúdo muito ressecado, mucosas intestinais congestionadas e quase todos órgãos da cavidade apresentavam aspecto de “órgãos em processo de autólise”, tais factos demonstram a necessidade de focar não apenas no tratamento dos sintomas corriqueiros da erliquiose, mas também, nestes sinais digestivos-atonía ruminal (que podem ser decorrentes do curso clínico da doença) que sem dúvida são de grande impacto na restauração da saúde animal. Para tal, é recomendado a transferência de conteúdo ruminal de um animal saudável para o animal em tratamento com intuito de estimular a função ruminal

A avaliação clínica completa dos animais a serem submetidos no experimento é essencial (Pascucci, 2014), pois permitirá a exclusão de animais com indícios de doença ou mesmo com uma temperatura

Inoculação de BALL 3 como método adicional de diagnóstico da causa de mortalidade de bovinos em palmeiras

acima dos parâmetros aceitáveis para a espécie (febre), prevenindo deste modo, a inoculação do agente patogênico acentuando o mau estar animal. Nenhum dos animais submetidos no estudo apresentava sinais clínicos que remetessem a doença e que condicionassem a inoculação. As temperaturas retais eram aferidas diariamente até o fim do período de observação (Lente, 1979).

Mapham e Vorster (2017) em seu estudo sobre a erliquiose em ruminantes descrevem que o período de incubação após a inoculação intravenosa de sangue é de 7 à 10 dias em ovinos e caprinos e de 10 à 16 dias em bovinos. No estudo (ano 2023) o período de incubação teve uma variação 2 à 10 dias; considerando que interações individuais com o sistema imunológico, a virulência do isolado, e a quantidade de material infectante administrado, podem ter influência no curso da doença, a variabilidade do período de incubação observada no estudo, é bem explicada (Van Seventer e Hochberg, 2017). Outro facto que pode estar associado ao curto período de incubação observado no estudo, pode ser a falha na aferição da temperatura pré-inoculação, isto é, existe a probabilidade de que o animal que reagiu no dia 2 após a inoculação já apresentasse febres antes da mesma.

Todos animais (excepto o V.46) experimentados em 2023 apresentaram uma elevação de temperatura a inoculação de Ball 3. Tendo em conta que a única medida disponível para definição do sucesso à inoculação é o surgimento das reacções de temperatura após a mesma (Arnold e Asselbergs, 1979), considera-se o experimento como tendo sido de sucesso. A idade dos animais, como apontado por Prozesky (1987) pode ter sido um factor contribuinte para o sucesso do experimento, visto que, segundo este autor vitelos de até 3 semanas de idade (idade menor aos animais inclusos no estudo) têm um elevado grau de resistência natural que não está relacionado com o estado imunitário da mãe, podendo a maioria destes resistir a infecção por BALL 3.

Por não ter havido uma reacção febril no animal V.46 o gráfico 2023 indica uma reacção de apenas 5 animais (83,3%), porém, apesar de não ter apresentado uma reacção febril (ou pelo menos não foi detectada durante todo período de observação) este animal, apresentou outros sinais como: tosse, inapetência e tendo sido realizado o mesmo tratamento efectuado nos outros 5 animais apresentou resultados satisfatórios. A ausência da reacção de temperatura neste vitelo pode ser justificada pelo facto de que infecções leves ou subclínicas também serem possíveis e com maior probabilidade de afectar animais jovens e/ou animais parcialmente imunes, e nesses casos o único sinal de doença pode ser uma febre transitória (Spickler, 2015), além disso segundo Lente (1979) cerca de 3% dos animais infectados experimentalmente, desenvolvem outros sinais clínicos visíveis antes de mostrar uma reacção de temperatura, e dentre os sinais apresentados pelo V.46 os sinais respiratórios enquadram-se entre os mais comuns nessa categoria.

Embora tenha apresentado outros sinais clínicos decorrentes da infecção por *E. ruminantium*, por não ter demonstrado uma reacção febril que é o critério usado para determinar o sucesso da imunidade

Inoculação de BALL 3 como método adicional de diagnóstico da causa de mortalidade de bovinos em palmeiras

por inoculação de BALL 3, seria necessário quantificar os anticorpos neste animal em particular e nos outros também para confirmar se o inóculo teve o efeito desejado ou não.

Embora não faça menção de alguma resistência nos animais com uma idade de 3 semanas, Lente (1979) afirma que ainda que todos desenvolvam uma boa imunidade, se forem inoculados neste período, apenas cerca de 20% apresentarão febre, dificultando deste modo a avaliação do sucesso do experimento através desta variável (temperatura), deste modo a idade dos animais do estudo facilitou a avaliação pois dos mesmos, 83% manifestaram uma elevação na temperatura.

Lawrence *et al.* (1995) em seu estudo para descrever que a resposta sorológica à imunização com Ball 3 em bovinos é um indicador de imunidade protetora, descreve que animais sem imunidade reagem a inoculação apresentando sinais clínicos tais quais os apresentados pelos animais inseridos no estudo, daí que verificada principalmente a reação de temperatura nestes animais, indicou sem dúvida a ausência de imunidade contra erliquia por parte dos mesmos, ressaltando o facto de que realmente os animais eram levados à morte por esta enfermidade, sublinhando a necessidade de protecção destes animais contra o desafio de campo ao qual estão constantemente submetidos.

Em relação ao tratamento, alguns autores divergem no protocolo a ser seguido; uma vertente tem aconselhado o tratamento dos animais infectados imediatamente após a reação de temperatura, enquanto, outra aconselha que o tratamento seja apenas realizado de 2 à 3 dias após o início da reação febril. RAPID (2001) relata que o tratamento imediato ou simultâneo (uso de implantes antibióticos em animais infectados artificialmente) em nada interfere no desenvolvimento da imunidade. Um estudo realizado por Escrivão *et al.*, (2014) indica que eram submetidos ao tratamento todos animais tão logo que estes apresentassem temperaturas iguais ou superiores a 39,6 °C, e o mesmo consistia em usar oxitetraciclina 10%, na dose de 10mg/kg de peso vivo, via intravenosa por dois a três dias, conforme baixamento ou não de temperatura e aplicado oxitetraciclina 20% na dose de 20mg/kg de peso vivo, via intramuscular, no último dia de tratamento. No entanto, Du Plessis e Malan (1987) citados por Lente (1987) e Lawrence *et al.*, (1995) referem que os animais tratados precocemente podem não adquirir uma imunidade adequada, nesta vertente aconselha o tratamento dos animais apenas no segundo ou terceiro dia após a reação febril, este tratamento é repetido 24h depois a menos que a temperatura tenha voltado ao normal após o primeiro tratamento. Alguns tratadores optam por repetir o tratamento no dia seguinte independentemente da temperatura estar baixa ou não.

Neste experimento, o tratamento dos animais era realizado imediatamente após a detecção da reação febril, e a princípio os resultados foram positivos, apesar destes resultados e dos resultados que foram possíveis verificar nos animais inoculados nos anos anteriores (visto que nenhum deles

Inoculação de BALL 3 como método adicional de diagnóstico da causa de mortalidade de bovinos em palmeiras

teve uma morte causada pela doença em causa até então), a quantificação dos títulos de anticorpos seria necessária, assim como a monitorização dos animais por um período maior de tempo, de modo a avaliar a duração da imunidade nos animais e conferir se a instituição imediata ou tardia (2 a 3 dias) do tratamento interfere no desenvolvimento e na durabilidade da mesma (Semu *et al.*, 1992; Asselbergs *et al.*, 1993).

Oxitetraciclina na dose de 10 mg/kg (I.V) foi instituída para tratamento inicial; este fármaco foi usado devido ao seu mecanismo bacteriostático, que actua pela inibição da síntese proteica da *E.ruminantium*.

Como tratamento de suporte, diclofenac na dose de 2,5 mg/kg; Este fármaco contém o sal potássico de diclofenac, um composto não esteróide com propriedades analgésicas, anti-inflamatórias e antipiréticas pronunciadas. Diclofenac possui um início de acção rápido, o que o torna particularmente indicado no tratamento da dor aguda e de estados inflamatórios. Vitaminas do complexo B5ml/por animal foram também administradas com o objectivo de estimular a ingestão dos alimentos pelos animais, pois um dos sinais clínicos por eles apresentados era a inapetência;

Todos fármacos eram administrados por um período de 3 dias seguidos, conforme recomendado pela entidade fabricante.

O método de tratamento usado no estudo é referido por Uilenberg (1983, 1984) citados por Lente (1987) como "infecção e tratamento", implica o monitoramento rigoroso dos animais inoculados e a aplicação do tratamento assim que a reacção febril começar, exactamente como procedido no experimento e o mesmo é perfeitamente aplicável para grupos menores como é o caso no estudo corrente.

Pela impraticidade de monitorar individualmente os animais em grandes manadas, existe uma modificação do método de "infecção e tratamento". Neitz & Alexander (1945); Fick & Schuss (1952); Poole (1962) citados por Lente (1987) mencionam que esta modificação denomina-se "método de bloco" e consiste em tratar os animais bem antes do início da reacção febril.

Em seu estudo Arnold e Asselbergs (1979) optaram pelo "método de bloco" devido aos grandes requisitos de mão-de-obra previstos para lidar com muitas reacções em simultâneo, no qual o protocolo de tratamento consistia de uma dose única de oxitetraciclina no 12º dia após a inoculação ou quando pelo menos 25% dos animais do grupo reagem. No entanto, esse tratamento em bloco dificulta a avaliação da imunidade alcançada, pois posteriormente se tornou impossível decidir se os indivíduos haviam de facto reagido à inoculação e qual era o estado imunológico desses animais.

Inoculação de BALL 3 como método adicional de diagnóstico da causa de mortalidade de bovinos em palmeiras

Como referido anteriormente, para a Erliquiose, as únicas medidas disponíveis de provável sucesso antes que os animais sejam expostos ao desafio de campo são a avaliação das reacções de temperatura à inoculação e a resposta a infecção (Arnold e Asselbergs, 1979). Neste caso, apesar da praticidade no caso de populações extensas o método de bloco pode ser visto como uma desvantagem por não permitir avaliar de forma individual a reactividade dos animais a infecção, e como se pode imaginar, dificultando a decisão sobre a aquisição de imunidade por parte destes indivíduos.

Estudos com objectivo de avaliar a técnica de infecção e tratamento como uma estratégia de imunização eficaz para *E. Ruminantium* em Moçambique devem ser realizados. A presença do vector e do agente responsável por causar a doença, bem como de hospedeiros susceptíveis, torna o País elegível para o uso desta técnica; ademais, as dificuldades que se tem enfrentado na profilaxia e tratamento da erliquiose e, as constantes mortes que se tem observado em bovinos e em pequenos ruminantes principalmente após épocas chuvosas, deve levar a avaliação deste método como alternativa para proteger as manadas destes desafios. É ainda necessário que se avalie a eficácia dos inóculos comerciais em conferir imunidade aos animais locais, visto que estes não são produzidos com base nas estirpes encontradas em Moçambique. É evidente que estas preparações têm sido bastante úteis e tem conferido imunidade aos animais até certo ponto (o estudo em causa prova este facto), é porém necessário testar e comparar a solidez e a durabilidade desta imunidade quando usadas preparações produzidas com base em estirpes locais em detrimento das não locais, de modo que se verifique a existência ou não de diferenças expressivas nos resultados obtidos.

O estudo permitiu visualizar em certa escala a capacidade de BALL 3 de induzir a uma imunidade nos animais; foi possível notar através dos registos que em todos animais inoculados nos anos anteriores nenhum deles teve uma morte causada pela erliquiose, apesar dos surtos que foram observados anos depois da sua “imunização”, era observado que apesar desses animais apresentarem febre alguns recuperavam espontaneamente e os que necessitavam de tratamento respondiam positivamente ao mesmo, o que solidifica a teoria de uso de BALL 3 como método eficaz para imunização de bovinos, em contrapartida parte dos animais que adoeceram posteriormente que não tenham sido submetidos à inoculação morriam apesar do tratamento realizado, este ponto, reforça mais ainda a ausência de imunidade por parte de todos animais que não foram infectados experimentalmente naquela exploração.

Em suma embora os gráficos não cheguem a uma percentagem de 100% no experimento-2023, os resultados obtidos são bastantes satisfatórios.

9. LIMITAÇÕES DO ESTUDO

- Apesar de que através dos dados possíveis de colher neste estudo fosse possível estabelecer a capacidade de BALL 3 em responder ao principal objectivo da pesquisa, o facto de uma considerável quantidade de fichas de registo das termometrias dos anos entre 2018 à 2022 não estarem preenchidas de forma completa, constituíram limitações solenes deste estudo.
- A tempo e recursos disponíveis para a realização deste estudo constituíram um entrave, visto que impossibilitaram a realização da quantificação de anticorpos anti-erliquia, dificultando a determinação exata dos títulos produzidos por esse tipo de método assim como a duração de imunidade induzida pelo mesmo.

10. CONCLUSÃO

Há ocorrência de Erliquiose na exploração pecuária Inácio de Sousa. Através deste estudo foi possível provar clinicamente e laboratorialmente que as mortes dos animais eram causadas por *E. ruminantium* e associado à isso, as reacções dos animais ao inóculo são um indicativo de ausência de protecção nos mesmos, o que explica as mortes de animais na exploração. Pelos sinais observados após a inoculação foi ainda possível demonstrar que BALL 3 é capaz de induzir a imunidade tornando este método como uma alternativa para garantir a imunização de bovinos e proteger esses animais contra os desafios de campo, podendo deste modo ser um caminho para a redução de mortes nos períodos de maior surto.

11. RECOMENDAÇÕES

É notável que o País, particularmente a região sul enfrenta mortes massivas de gado bovino e a principal causa disso são as doenças transmitidas por carraças, facto este que se demonstra através de muitos estudos ser um entrave não recente, no entanto, ano após ano o número de animais que morrem após períodos de chuva é elevado, o que torna essa situação cada vez mais preocupante não só para os profissionais veterinários, mas também aos produtores de gado bovino, visto que antes de afectar a economia do País este mal afecta-os grandemente. Existe a necessidade de se abordar medidas que visam conter às mortes, tornando-se possível enfrentar as épocas de maior surto com um certo preparo e sem levar a perdas alarmantes à cada ano.

Embora os resultados deste estudo não possam ser generalizados para representar a prevalência de *Ehrlichia ruminantium* em bovinos de toda região, crê-se que o mesmo serve de espelho do que ocorre em toda região. O sucesso do uso do inóculo na exploração deverá ser considerado como uma motivação para a sua expansão.

Em decorrência disso recomenda-se:

Aos futuros trabalhos académicos

- Dos inúmeros estudos que se podem realizar como continuidade do trabalho em causa, recomenda-se o desenvolvimento de pesquisas que visam não apenas a inoculação mas também a quantificação de anticorpos resultantes da inoculação por BALL 3.
- É ainda importante a realização de estudos que visam testar e comparar a eficácia das diversas estirpes de inóculos disponíveis comercialmente.
- À observação dos animais inoculados por um período maior de tempo de modo a definir-se com exactidão a durabilidade da imunidade conferida por BALL 3
- Recomenda-se estudos que visam a produção de inóculos com base nas estirpes locais.

A exploração Inácio de Sousa

- Que os registos das inoculações sejam completamente preenchidos e informatizados de modo que seja possível realizar uma adequada avaliação em todos anos.

12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIAS

1. Allsopp B.A.; Bezuidenhout, J.D. e Prozesky, L. (2004). '**Heartwater**'. Coetzer J.A.W. & Tustin R.C. (eds.), *Infectious diseases of livestock*. Vol. 2, pp. 507–535.
2. Allsopp, B.A. (2009). **Department of Veterinary Tropical Diseases, Faculty of Veterinary Science**. University of Pretoria Private Bag X04, Onderstepoort. 0110 South Africa.
3. Bezuidenhout, J D. (2009). **Heartwater: An abridged historical account**. *Journal of the South African Veterinary Association* , 80(4), pp. 208-209.
http://www.scielo.org.za/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S101991282009000400003&lng=en&tlng=en
4. Allsopp B. A. (2010). **Natural history of Ehrlichia ruminantium**. *Veterinary parasitology*, 167(2-4), 123–135. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.09.014>
5. Allsopp B. A. (2015). **Heartwater-Ehrlichia ruminantium infection**. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 34(2), 557–568. <https://doi.org/10.20506/rst.34.2.2379>
6. Anifowose, O. I.; Takeet, M. I.; Talabi, A. O.; e Otesile, E. B. (2020). **Molecular detection of Ehrlichia ruminantium in engorged ablyomma variegatum and cattle in Ogun State, Nigeria**. *Journal of parasitic diseases. Official organ of the Indian Society for Parasitology*, 44(2), 403–410. <https://doi.org/10.1007/s12639-020-01218-4>
7. Anonimo (2016). **Heartwater can be reduced with an animal feed supplement**. In Sheep News.
8. Arnold, R.M., Asselbergs, M. (1979). **Immunization of cattle imported into Mozambique**. Tick-borne diseases selected articles from the WORLD ANIMAL REVIEW. Vol. 19. ISBN 92-5-1012890-X.
9. Asselbergs, M.; Jongejan, F.; Langa, A.; Neves, L. e Afonso, S.(1993) **Antibodies to Cowdria ruminantium in Mozambican goats and cattle detected by immunofluorescence using endothelial cell culture antigen**. *Tropical Animal health and production*. 144-150. <https://doi.org/10.1007/BF02236232>. PMID: 8236490.
10. Babsola, O.; Spickler, A. R. e Davis, R. (2011). **Heartwater**. *Center for Food Security and Public Health*. Iowa State University. College of Veterinary
11. Barré, N.; Garris, G. e Camus, E. (1995). **Propagation of the tick Amblyomma variegatum in the Caribbean**. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 14(3), 841–855. <https://doi.org/10.20506/rst.14.3.883>.
12. Bezuidenhout J. D. (1987). **Natural transmission of heartwater**. *The Onderstepoort journal of veterinary research*. 54(3), 349–351. PMID: 3329324.
13. Provost, A., e Bezuidenhout, J. D.(1987). **The historical background and global importance of heartwater**. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 54, 165-169.

14. Biguezoton, A.; Noel, V.; Adehan, S.; Adakal, H.; Kossigan Dayo G.; Zoungrana, S.; Farougou, S. e Chevillon, C. (2016). **Ehrlichia ruminantium infects Rhipicephalus microplus in West Africa**. *Parasites Vectors* **9**, 354. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1651-x>
15. Cangi, N. (2017). **New molecular high throughput methods for Ehrlichia ruminantium tick screening and characterization of strain genetic structure in Mozambique and at worldwide scale**.
16. Cangi, N.; Pinarello, V.; Bournez, L.; Lefrançois, T.; Albina, E.; Neves, L. e Vachiéry, N. (2017). **Efficient high-throughput molecular method to detect Ehrlichia ruminantium in ticks**. *Parasites Vectors* **10**, 566 <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2490-0>
17. Daniel E. S.; Robert S. L. e William L. N. (2002). **Medical and Veterinary Entomology**, Academic Press, 2002, Pag. 517-558, ISBN 9780125104517, <https://doi.org/10.1016/B978-012510451-7/50026-8>.
18. Deem, S. L. (2008). **Heartwater (Ehrlichia ruminantium), Zoo and Wild Animal Medicine**. 6ªEd. Pages 438-443, ISBN 9781416040477, <https://doi.org/10.1016/B978-141604047-7.50057-9>.
19. Du Plessis, J. L. (1985). **The natural resistance of cattle to artificial infection with Cowdria ruminantium: the role played by conglutinin**. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, **52**, 273—277.
20. Du Plessis, J. L.; Malan, L. e Kowalski, Z. E. (1987). **The pathogenesis of heartwater**. *The Onderstepoort journal of veterinary research*, **54**(3), 313—318. PMID: 3329321.
21. Du Plessis, J.L. e Bezuidenhout, J.D. (1979). **Investigations on the natural and acquired resistance of cattle to artificial infection with Cowdria ruminantium**. *Journal of the South African Veterinary Association*. **50**(4):334-338. PMID: 553974.
22. Dumler, J. S.; Barbet, A. F.; Bekker, C. P.; Dasch, G. A.; Palmer, G. H.; Ray, S. C.; Rikihisa, Y. e Rurangirwa, F. R. (2001). **Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of Ehrlichia equi and 'HGE agent' as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophila**. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, **51**(Pt 6), 2145—2165. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-6-2145>
23. Escrivão, R. J. A.; Mambonhe, N. E. G.; Deve, J. e Ibraimo, S. (2014). **Estratégias para reduzir a mortalidade de bovinos importados de zonas livres da Erlichiose para zonas de risco em Moçambique**. O papel dos recursos naturais renováveis no desenvolvimento sustentável em Moçambique.

24. Galbat, S. A. e Keshta, H. G. (2020). **Evaluation of rumen transfaunation after treatment of rumen acidosis in cows.** Current Science International. EISSN: 2706-7920 ISSN: 2077-4435 DOI: 10.36632/csi/2020.9.4.55 Volume: 09. Pages: 625-632.
25. Jongejan, F.; Berger, L. e Busser, S. (2020). **Amblyomma hebraeum is the predominant tick species on goats in the Mnisi Community Area of Mpumalanga Province South Africa and is co-infected with Ehrlichia ruminantium and Rickettsia africae.** Parasites Vectors 13, 172 <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04059-5>
26. Kasari, T. R.; Miller, R. S.; James, A. M. e Freier, J. E. (2010). **Recognition of the threat of Ehrlichia ruminantium infection in domestic and wild ruminants in the continental United States,** Journal of the American Veterinary Medical Association, 237(5), 520-530. <https://doi.org/10.2460/javma.237.5.520>
27. Lawrence, J.A.; Tjornehoj, K.; Whiteland, A.P. e Kafuwa, P.T. (1995). **La réponse sérologique à l'immunisation contre la cowdriose coystitue un indicateur effectif du degré de protection immunitaire.** Revue Elev. Méd. vét. Pays trop., 48 (1) : 63-65
28. Lente, V. M. (1979). **Field experience with heartwater (Cowdria ruminantium) in cattle.** Journal of the South African Veterinary Association. No.4 323-325
29. Lente, V. M. (1987). **The infection and treatment method of vaccination against heartwater.** Onderstepoort Journal of Veterinary Research, 54,489-491.
30. Mapham, P.H., Vorster. J.H. (2017). **Heartwater in Cattle and Small Ruminants.** Vol. 21.
31. Marcelino, I.; Holzmuller, P.; Coelho, A.; Mazzucchelli. G.; Fernandez, B. e Vachiéry, N. (2021) **Revisiting Ehrlichia ruminantium Replication Cycle Using Proteomics: The Host and the Bacterium Perspectives.** Microorganisms.; 9(6):1144.
32. Matos, C. A.; Gonçalves, L. R.; de Souza Ramos, I. A.; Mendes, N. S.; Zanatto, D. C. S.; André, M. R. e Machado, R. Z. (2019). **Molecular detection and characterization of Ehrlichia ruminantium from cattle in Mozambique.** Acta tropica, Vol. 191, 198–203. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.01.007>
33. (Merck) (2011). **Important Ixodid ticks: Amblyomma spp.** *The Merck Veterinary Manual.* (Data de acesso: 13 Julho 2023).
34. Mireille V.S.; Abel S. B.; Sébastien Z.; Adrien, Z. e Adrien M. G. B. (2023). **Epidemiology of heartwater disease in West Africa: similar infection rate of Ehrlichia ruminantium evidenced in adults of Amblyomma variegatum and Rhipicephalus microplus in peri-urban villages of Bobo-Dioulasso, Burkina Faso.** Int. J. Biol. Chem. Sci. 17(2): 400-406, February 2023, ISSN 1997-342X.
35. Mulinge (1990). **The Pathogeneses And Clinical pathology Of Cowdriosis [Heartwater] In Sheep.** University of Nairobi Department of Clinical Studies. Faculty of Veterinary Medicine.

36. Molepo, L.C.; Byrom B.; Weyers, B.; Abdelatif, N.; Mahan, S.M.; Burridge, M.J.; Barbet, A.F. e Latif, A.A. (2022). **Development of inactivated heartwater (*Ehrlichia ruminantium*) vaccine in South Africa, Ticks and Tick-borne Diseases**, Vol. 13, Issue 3. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2022.101942>
37. Nair, A.; Hove, P.; Liu, H. e Wang, Y. (2021). Cino-Ozuna, A.G.; Henningson, J.; Ganta, C.K.; Ganta, R.R. **Experimental Infection of North American Sheep with *Ehrlichia ruminantium***. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 10(4), 451. <https://doi.org/10.3390/pathogens10040451>
38. Neitz, W. e Alexander, R. A. (1945). **Immunization of Cattle against Heartwater and the Control of the Tick-Borne Diseases, Redwater, Gallsickness and Heartwater**. By, Section of Protozoology and Virus Diseases, Onderstepoort. Onderstepoort Journal of Veterinary Science and Animal Industry, Vol. 20. <http://hdl.handle.net/2263/59277>
39. OIE-World Organization for Animal Health. (2009). **Heartwater – Cowdriosis**. Disponível em: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/Disease_cards/HEARTWATER_FINAL.pdf
40. Pascucci, I.; Di Domenico, M.; Di Mattia, T.; Molini, U.; Pini, A. e Scacchia, M. (2014). **Study of heartwater by infection of sheep with Ball 3 *E. ruminantium* stock in Namibia: clinical symptoms, gross lesions and molecular diagnosis**. Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell’Abruzzo e del Molise “G. Caporale” - Campo Boario 64100 Teramo – Italy. Private veterinarian. Central Veterinary Laboratory - Ministry of Agriculture Water and Forestry. 20(5):215-219
41. Peregrine, A.S. (1994). **Chemotherapy and delivery systems: haemoparasites**, *Veterinary Parasitology*, Vol. 54, Issues 1–3, Pages 223-248, ISSN 0304-4017, [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(94\)90092-2](https://doi.org/10.1016/0304-4017(94)90092-2).
42. Pereira, P.F.V.; Romão, F.T.N.A.M.; Penzeti, E.M.; Sanches, J.F.Z.; Curti, J.M.; Flaiban, K.K.M.C. e Lisboa, J.A.N. (2018). **Importância da transfaunação no tratamento da acidose láctica ruminal aguda induzida em cabras e ovelhas. Pesquisa Veterinária Brasileira**. Departamento de Clínicas Veterinárias, Universidade Estadual de Londrina, Campus Universitário, Londrina, PR 86057-970.
43. Pfitzer, S.; Last, R. e Waal, D.T (2004). **Possible death of a buffalo calf (*Syncercus caffer*) due to suspected heartwater (*Ehrlichia ruminantium*)**. *Journal of the South African Veterinary Association*, 75(1): 54–57. <https://doi.org/10.4102/jsava.v75i1.451>
44. Prozesky, L. e Du Plessis, J. L. (1987). **Heartwater. The development and life cycle of *Cowdria ruminantium* in the vertebrate host, ticks and cultured endothelial cells**. *The Onderstepoort journal of veterinary research*, 54(3), 193–196 PMID: 3329309.

45. Purnell, R. (1984). **Control of heartwater in cattle in Southern Africa using terramycin/LA.** *Preventive Veterinary Medicine*, 2, 239-254.
46. Purnell, R.E (1987). **Development of a prophylactic regime using Terramycin/LA to assist in the introduction of susceptible cattle into heartwater endemic areas of Africa.** *Onderstepoort Journal of Veterinary Research.*, 54,509-512.
47. Purnell, R.E.; Gunter, T.D. e Schroder, J. (1989). **Development of a prophylactic regime using long-acting tetracycline for the control of redwater and heartwater in susceptible cattle moved into an endemic area.** *Trop Anim Health Prod* 21, 11–19
<https://doi.org/10.1007/BF02297335>
48. (PWTL): **Potential Worldwide Threats for Livestock. Gap Analysis Workshop Report.** (2018). Agricultural Research Service, Washington, D.C.
49. Van de Pypekamp H. E. e Prozesky L. (1987). **Heartwater. An overview of the clinical signs, susceptibility and differential diagnoses of the disease in domestic ruminants.** *The Onderstepoort journal of veterinary research*, 54(3), 263–266.
50. RAPID: Regional Activity to Promote Integration Through Dialogue and Policy Implementation (2001). **Heartwater Disease Research Project Review**, Gaborone, Botswana, Chemonics International, Inc.
51. Rensburg, O.V. (2017). **Heartwater costs the livestock industry millions**, *Revista Afrivet*.
52. Semu, S. M.; Mahan, S. M.; Yunker, C. E. e Burrige, M. J. (1992). **Development and persistence of Cowdria ruminantium specific antibodies following experimental infection of cattle, as detected by the indirect fluorescent antibody test.** *Veterinary immunology and immunopathology*, 33(4), 339–352. [https://doi.org/10.1016/0165-2427\(92\)90005-b](https://doi.org/10.1016/0165-2427(92)90005-b)
53. Silva, L. das D. F. da .; Ezequiel, J. M. B.; Azevedo, P. S. de .; Cattelan, J. W.; Barbosa, J. C.; Resende, F. D. de. e Carmo, F. R. G. (2002). **Digestão total e parcial de alguns componentes de dietas contendo diferentes níveis de casca de soja e Fontes de nitrogênio, em bovinos.** *Revista Brasileira De Zootecnia*, 31(3), 1258–1268. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982002000500024>
54. Shakespeare, A. S.; Reyers. F. Van Amstel, S. R.; Swan, G.E. e Van den, B. J. S. (1998). **Treatment of heartwater: potential adverse effects of furosemide administration on certain homeostatic parameters in normal sheep.** *Journal of the South African Veterinary Association*, 69(4), 129–136. <https://doi.org/10.4102/jsava.v69i4.841>
55. Shakespeare, A.S. (2014). **The Merck Veterinary Manual.** Acessado em <http://www.merckvetmanual.com/mvm/index.html>.
56. Spickler, A. R. (2015). **Heartwater.** Acessado em <http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/factsheets.php>.

57. Steiner, S.; Linhart, N.; Neidl, A.; Baumgartner, W.; Tichy, A. e Wittek, T. (2019). **Evaluation of the therapeutic efficacy of rumen transfaunation.** *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 104(1), 56–63. <https://doi.org/10.1111/jpn.13232>
58. Steyn, H.C.; Pretorius, A.; McCrindle, C.M.; Steinmann, C.M. e Van Kleef, M (2008). **A quantitative real-time PCR assay for Ehrlichia ruminantium using pCS20.** *Veterinary microbiology*, 131(3-4), 258–265. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.04.002>
59. Uilenberg, G. (1981). **Heartwater Disease.** In: Ristic, M., McIntyre, W.I.M. (eds) **Diseases of Cattle in the Tropics.** Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science, Vol 6. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-011-9034-3_28
60. Van Amstel, S. R. e Oberem, P. T. (1987). **The treatment of heartwater.** *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*; 54,475-479.
61. Van Seventer J.M. e Hochberg N.S.(2017). **Principles of Infectious Diseases: Transmission, Diagnosis, Prevention, and Control.** *International Encyclopedia of Public Health*. 22–39. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803678-5.00516-6>
62. Walker, J. B. (1987). **The tick vectors of Cowdria ruminantium (Ixodoidea, Ixodidae, genus Amblyomma) and their distribution.** *The Onderstepoort journal of veterinary research*, 54(3), 353–379
63. World Organisation for Animal Health [WOAH] (2002). – *Terrestrial Animal Health Code.* OIE, Paris
64. Yonow T. (1995). **The life-cycle of Amblyomma variegatum (Acari: Ixodidae): a literature synthesis with a view to modelling.** *International journal for parasitology*, 25(9), 1023–1060. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(95\)00020-3](https://doi.org/10.1016/0020-7519(95)00020-3).

13. ANEXOS

Anexo I: Protocolo de inoculação de BALL 3 (descongelamento rápido)

1. Identifique todos animais a serem usados no estudo;
2. Transporte o inócuo em nitrogênio líquido ou em gelo seco até a área de trabalho;
3. Descongele em água morna a 38 °C (aproximadamente a temperatura corporal) apenas a quantidade suficiente para administrar imediatamente;
4. Contenha o animal causando o mínimo estresse possível, e aferir a temperatura pré-inoculação;
5. Identifique a veia jugular e administre lentamente 3ml da preparação na veia jugular;
6. Monitore a temperatura dos animais a partir do dia 1 pós-inoculação.
7. Administre antibiótico (oxitetraciclina curta acção) tão logo que os animais apresentem reacção de temperatura.

Anexo II: fotografias



Figura V. Animal morto; Hidropericardio numa vaca (fonte: autora).

Inoculação de BALL 3 como método adicional de diagnóstico da causa de mortalidade de bovinos em palmeiras



Figura VI. Sinais respiratórios (fonte: autora).



Figura VII. Hidrotorax e pulmões congestionados (edema-pulmomonar num ovino) (fonte: autora).


REPÚBLICA DE MOÇAMBIQUE

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DESENVOLVIMENTO RURAL
INSTITUTO DE INVESTIGAÇÃO AGRÁRIA DE MOÇAMBIQUE
DIRECÇÃO DE CIÊNCIAS ANIMAIS
LABORATÓRIO CENTRAL DE VETERINÁRIA

Análise: 869	Data de entrada: 16/08/2022		
Proprietário: Inácio de Sousa Lda	Interessado: Rafael Escrivá - FAVET		
Provincia: Maputo	Distrito: Manhiça	Localidade: Palmeira	
Designação do Material: Gânglio e cérebro de bovinos.			
Espécie: Bovina	Raça: Cx	Sexo: MF	Idade: > 10 anos

Resultados

Exame Parasitológico:
Gânglio 1, 2 e 3:
Positivo a *Theileria parva*.

Cérebro 1, 2, 3 e 4:
Positivos a *Ehrlichia ruminantium*.

Diagnóstico final: theileriose associado à *Ehrlichia ruminantium*.

Data: 22/08/2022

A Chefe do Laboratório
Tolanda Manjane
Tolanda Manjane
(Investigadora Auxiliar)

Figura VIII. Resultados laboratoriais referentes as amostras provenientes de alguns animais mortos. Ano 2022

Inoculação de BALL 3 como método adicional de diagnóstico da causa de mortalidade de bovinos em palmeiras


 REPÚBLICA DE MOÇAMBIQUE
 MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DESENVOLVIMENTO RURAL
 INSTITUTO DE INVESTIGAÇÃO AGRÁRIA DE MOÇAMBIQUE
 DIRECÇÃO DE CIÊNCIAS ANIMAIS
 LABORATÓRIO CENTRAL DE VETERINÁRIA

Análise: 210 Data de entrada: 23/03/2023
 Proprietário: Inácio de Sousa Interessado: Rafael Escrivão
 Província: Maputo Distrito: Manhica Localidade: Palmeira
 Designação do Material: 07 Gânglios e 07 cérebros de bovinos.
 Espécie: Bovina Raça: Jersey Sexo: F Idade: várias

Resultados

Exame Parasitológico:
Cérebro
 Positivo a *Ehrlichia ruminantium* nos n.ºs: 1, 2 e 107
 Negativo a pesquisa de hemoparasitas no n.º: 13036.
 Em estado avançado de autólise nos n.ºs: 3, 4 e 5.

Gânglios linfáticos
 Positivo a *Theileria parva* nos n.ºs: 4 e 1336
 Negativo a pesquisa de hemoparasitas nos n.ºs: 1, 2, 3, 5 e 107.
 Os restantes órgãos: Fígado, Baço, Pulmão e Rim em autólise.

Data: 31/03/2023

A Chefe do Laboratório
Iolanda Monjane
 Iolanda Monjane
 (Investigador Auxiliar)

Figura IX. Resultados laboratoriais das amostras de 7 cérebros de animais tratados sem sucesso.

30/5/23		18/05/23	
Valores de leite	temperatura	Manhã	Atardecer
53/23	38.1 - 39.5	53/23	38.2 - 39.4
51/23	37.9 - 39.3	53/23	38.0 - 39.4
50/23	38.2 - 40.2	51/23	38.9 - 40.4
49/23	37.9 - 39.6	50/23	38.4 - 40.0
47/23	38.2 - 39.6	49/23	38.1 - 39.8
46/23	38.4 - 39.5	47/23	38.1 - 39.6
De Manhã A TARDE		46/23	38.5 - 39.9
04/05/23	53/23 - 37.9 - 38.9	11/23	36.3 - 39.1
	51/23 - 38.6 - 39.7	08/22	34.4 - 39.8
	50/23 - 38.1 - 39.8	28/22	38.0 - 39.8
	49/23 - 38.0 - 40.7		Morto - Morto
	47/23 - 38.3 - 39.5		37.1 - 39.0
	46/23 - 38.3 - 38.7		

Figura X. Registo das temperaturas de inoculação- 2023.