

FREQÜÊNCIA DE INFECÇÃO POR *Neospora caninum* EM DOIS DIFERENTES SISTEMAS DE PRODUÇÃO DE LEITE E FATORES PREDISPONENTES À INFECÇÃO EM BOVINOS EM MINAS GERAIS

Frequency of *Neospora caninum* infection in two different milk production system and predicting factors to infection on cattle herds in the State of Minas Gerais, Brazil

MELO¹C.B. DE, LEITE^{2,3}R.C., SOUZA^{2,3}G.N. DE & LEITE^{2,3}R.C.

(1) DEA/CCBS/UFS - Cidade Universitária Prof. José Aloísio de Campos, Jardim Rosa Elze CEP 49100-000, São Cristóvão, Sergipe - Brasil. Autor para correspondência. E-mail: cristus18@hotmail.com; (2) DMVP, Escola de Veterinária, UFMG, Belo Horizonte, MG - Brasil; (3) Bolsista do CNPq.

SUMMARY: The objective of this study was to establish the frequency of infection and to analysis predicting factors to *Neospora caninum* infection on two milk production system in calves, heifers and cows from 18 dairy herds of the state of Minas Gerais, Brazil. Five thousand and eighty-four bovine serum samples were screened in a commercial ELISA test. The samples were classified in two groups: 1) herds producer of the milk type A/B and 2) herds producer of the milk type C. Different ($p<0,001$) frequency of the *N. caninum* infection were observed, such as 27,31% (65 / 238 samples) in the herds of the group 1 and 12,72% (44 / 346 samples) in the herd of the group 2. Different frequency was also observed in the same age group of the different production system, but in the same milk production system, the age groups didn't differ ($p>0,05$). Predicting factors to *N. caninum* infection in these herds, such as technology applied on the production, stress, purchase and selling of cows, were discussed. **KEY WORDS:** *Neospora caninum*, cattle, predicting factor, milk, antibodies.

INTRODUÇÃO

Neospora caninum (Apicomplexa: Toxoplasmatinae) é um coccidio reconhecido como importante causa de abortamento em bovinos (DUBEY, 1999). Foi relacionado inicialmente como agente patogênico para bovinos por THILSTED & DUBEY (1989) e desde então, vem sendo associado a prejuízos econômicos consideráveis em toda a cadeia produtiva do leite. Vacas infectadas por *N. caninum* têm três vezes mais chances de abortar que vacas soronegativas (MAINAR-JAIME *et al.*, 1999). Perdas na ordem de US\$ 35 milhões anuais foram relatadas na Califórnia devido aos abortamentos (ANDERSON *et al.*, 1991) e, na Nova Zelândia as perdas econômicas anuais na indústria leiteira podem alcançar NZ\$ 16 milhões. Estes custos incluem os abortamentos, a proporção de vacas descartadas e a reposição do rebanho, a queda na produção leiteira, bem como na produção de gordura no leite (PFEIFFER *et al.*, 1997).

O parasito tem distribuição mundial (ANDERSON *et al.*, 2000). São relatadas duas formas de infecção nos bovinos. A forma vertical, mais freqüente (WOUDA *et al.*, 1999a) e a forma horizontal, em que os bovinos podem ser infectados pela ingestão de oocistos disseminados nas fezes de cães, que contaminam o pasto, silos ou ração bovina (DIJKSTRA *et al.*, 2001b). O cão é a única espécie atualmente relacionada como hospedeira definitiva do *N. caninum* (MCALLISTER *et al.*, 1998).

Em Minas Gerais, anticorpos contra *N. caninum* foram relatados inicialmente por MELO & LEITE (1999). Num estudo retrospectivo, a freqüência de anticorpos para o parasito, no estado em 1997, foi de 18,66%, sendo 17,94%, 20,63% e 18,18%, respectivamente, para fêmeas bovinas em três faixas etárias, de sete a 18 meses, 19 a 30 meses e para vacas com idade a partir de 31 meses (MELO *et al.*, 2001). Entretanto, os prejuízos causados pelo parasito nos rebanhos leiteiros do estado ainda não foram contabilizados, bem como ainda não foram relatados fatores que podem predispor à in-

fecção pelo parasita, bem como aqueles que maximizem a expressão patogênica desse agente nesses rebanhos.

Esse trabalho teve objetivos de determinar as frequências de infecção por *N. caninum* em dois sistemas de produção de leite (tipo C e tipo A/B) em rebanhos bovinos naturalmente infectados, comparar os dois sistemas e discutir possíveis fatores predisponentes à infecção por *N. caninum* em bezerras, novilhas e vacas de 18 rebanhos de Minas Gerais.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados 18 rebanhos leiteiros, totalizando 584 amostras de soro de bezerras, novilhas e vacas. O número de indivíduos amostrados em cada rebanho variou de 14 a 64 (Tabela 1). Estes rebanhos foram classificados em dois grupos: **1)** 238 animais provenientes de oito rebanhos produtores de leite tipos A/B, que foram caracterizados por serem constituídos de animais que produziam leite de melhor qualidade microbiológica, possuíam controle veterinário permanente, animais com alto grau de pureza racial, alta produtividade e geralmente, tinham um alto grau de renovação dos animais de produção (compra e venda), bem como a maioria deles era mantida confinada em “freestall”; **2)** 346 animais provenientes de dez rebanhos produtores de leite tipo C, que foram agrupados pelo fato do leite produzido ser de qualidade microbiológica inferior ao do primeiro grupo, principalmente em relação à contagem de coliformes fecais e totais, controle veterinário esporádico, animais com grau de pureza racial inferior ao do primeiro grupo (tipo comerciais ou mestiços) e em geral, ausência de estabulação.

Os 18 rebanhos pertenciam a 14 municípios de Minas Gerais (Tabela 1). As Amostras foram coletadas como parte de um grande projeto que envolveu a pesquisa de várias enfermidades, sendo amostrados 24 rebanhos que foram ordenados numericamente de um a 24. Entretanto, para essa análise, seis foram excluídos por se tratarem de rebanhos de corte. A maioria desses rebanhos era conhecida por já ter tido amostras de soro de alguns animais submetidas aos laboratórios do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (DMVP – EV – UFMG), para diagnóstico de brucelose, rinotraqueíte infecciosa bovina (RIB), diarreia bovina a vírus (DBV) ou leucose enzoótica bovina.

As amostras foram coletadas de acordo com amostragem aleatória estratificada entre novembro de 1996 e junho de 1997. A ocorrência de abortamentos não foi usada como critério para selecionar os animais ou os rebanhos. Os animais dos dois grupos foram estratificados de acordo com três faixas etárias: faixa I – animais de sete a 18 meses de idade; faixa II – animais de 19 – 30 meses de idade; faixa III – animais com idade a partir de 31 meses (Tabela 2). Apenas fêmeas foram amostradas e o estado de gestação não foi levado em consideração.

TABELA 1: Total de amostras analisadas, porcentagem de positivas para *Neospora caninum* e municípios de localização dos rebanhos estudados.

Rebanhos leiteiros	Total de amostras analisadas (n)	Porcentagem de positivas (%)	Município
tipo A/B			
1	45	8,89	Barbacena
3	29	20,69	Itabirito
4	33	72,73	Caeté
5	46	10,87	Pedro Leopoldo
6	23	47,83	Barbacena
22	34	35,29	Perdões
23	14	21,43	Lavras
24	14	0,00	Lavras
tipo C			
2	29	6,90	Ouro Preto
7	18	22,22	Pedro Leopoldo
8	44	25,00	Betim
9	27	3,70	Igarapé
12	64	6,25	Cordisburgo
13	27	3,70	Cordisburgo
14	50	22,00	Onça do Pitangui
15	18	5,56	Patos de Minas
16	29	10,34	Carmo do Paranaíba
19	40	15,00	Pompéu

TABELA 2: Tamanho das amostras necessárias por faixa etária em cada tipo de produção de leite.

Grupo de produção e faixa etária	População total	Amostras necessárias
leite C		
Faixa etária I	298	49
Faixa etária II	335	50
Faixa etária III	1087	56
Total	1720	155
leite A/B		
Faixa etária II	209	46
Faixa etária III	234	47
Faixa etária IV	675	54
Total	1118	147
Total geral	2838	302

Para o cálculo do tamanho da amostra foi utilizado o programa EPI-INFO 6 (DEAN *et al.* 1994), admitindo-se um erro de 3% e intervalo de confiança de 95%. Para estimar a frequência esperada utilizou-se como referência frequência de 11% para cada estrato da população, frequência essa inferior à encontrada por GONDIM *et al.* (1999). O tamanho das amostras necessárias em cada faixa etária estudada para as comparações, é apresentado na Tabela 2.

O sangue foi colhido uma única vez em cada animal por punção das veias coccígea ou jugular com agulhas descartáveis individuais e utilização de tubos de vidro a vácuo, sem aditivos. Em cada reba-

nho, todas as amostras foram colhidas em um único dia e após isso, foram imediatamente transportadas ao laboratório no DMVP – EV – UFMG (Belo Horizonte, Minas Gerais) para a separação do soro. O soro foi alíquotado e estocado à – 20° C até o uso.

Foi utilizado um “kit” ELISA indireto comercial⁴ e os testes foram realizados de acordo com as recomendações do fabricante. A leitura das placas foi executada em uma leitora automática⁵ em filtro de 620 nm. Esse teste é derivado de um ELISA originalmente descrito por PARÉ *et al.* (1995a) e o resultado é expresso como uma razão S/P baseada em um soro controle positivo e um negativo. Os resultados S/P < 0.50 foram considerados negativos e ³ 0.50 como positivos. A sensibilidade desse ELISA foi relatada ser de 98% e a especificidade de 87-92% (WOUDA *et al.*, 1998).

Para determinar se houve associação entre as frequências de infecção por *N. caninum*, os grupos estudados e entre suas respectivas faixas etárias, foi realizada análise estatística pelo teste χ^2 , com correção de Yates. A diferença foi considerada significativa quando $p < 0,05$ (SAMPALHO, 1998).

Questionários foram aplicados aos responsáveis pelos rebanhos, visando obter dados relacionadas às técnicas de manejo aplicadas aos rebanhos, uso de tecnologias e trânsito de animais (compra, venda, exposições etc), tipo de criação, indicadores produtivos, manejo sanitário, entre outros, que pudessem auxiliar na identificação de possíveis fatores de estresse aos quais os animais foram submetidos.

RESULTADOS

Em praticamente todos os rebanhos estudados, exceto em um rebanho produtor de leite A/B (rebanho 24), foram encontrados animais soropositivos para o parasito. Nos oito rebanhos produ-

res de leite A/B, a frequência de soropositividade variou de zero a 72,73%. Em todos os dez rebanhos produtores de leite tipo C, foram encontrados animais soropositivos e a frequência de soropositividade nestes rebanhos variou de 3,70% a 25%. O total de amostras analisadas, a porcentagem de amostras soropositivas e o município de cada rebanho individual, nos dois grupos de produção de leite estudados são apresentados na Tabela 1.

O número de amostras analisadas (n), o número de amostras soropositivas e a porcentagem de soropositividade por faixa etária, nos dois grupos produtores de leite estudados, são apresentados na Tabela 3.

Todos os responsáveis pelos rebanhos analisados responderam aos questionários no dia da visita, antes de serem iniciados os trabalhos de coleta das amostras de sangue. A situação dos rebanhos em relação ao *N. caninum* era totalmente desconhecida e os dados obtidos com os questionários são apresentados nas Tabelas 4 e 5.

A maioria dos rebanhos leiteiros do tipo C estudados era composta por animais da raça Holandês Preto e Branco (HPB) comerciais ou puros (88,9%). Entretanto, um rebanho era formado por animais da raça Jersey e outro era formado por animais da raça Pardo Suíço. Em todos os rebanhos leiteiros do tipo A/B, os animais eram da raça HPB puros (100%).

TABELA 3: Número de amostras analisadas (n), número de amostras soropositivas e porcentagem de soropositividade por faixa etária, nos dois grupos produtores de leite estudados.

Faixa etária	Leite C			Leite A/B		
	n	positivas	% positivas	n	positivas	% positivas
I	65	5	7,69% ^{b A}	52	16	30,77% ^{a A}
II	73	9	12,33% ^{d A}	53	17	32,08% ^{c A}
III	208	30	14,42% ^{f A}	133	32	24,06% ^{e A}
total	346	44	12,72%^b	238	65	27,31%^a

Na mesma linha, letras “a” e “b” \Rightarrow ($p < 0,001$); letras “c” e “d” \Rightarrow ($p < 0,01$); letras “e” e “f” \Rightarrow ($p < 0,05$).

Na mesma coluna, letras maiúsculas iguais não diferem ($P > 0,05$).

TABELA 4: Dados produtivos e reprodutivos médios dos rebanhos de leite C e leite A/B estudados.

Dado pesquisado	leite tipo C	leite tipo A/B
Intervalo médio de partos (meses)	14,7	14,3
Idade média à primeira cria (meses)	33,3	27,4
Idade média de descarte das vacas (anos)	10,2	9
Média de doses de sêmen por prenhes	1,7	1,7
Taxa média de fertilidade (%)	77,8	80,8
Porcentagem de rebanhos em que é usada inseminação artificial (IA).	90%	100%
Porcentagem de rebanhos estudados que já utilizaram TE.	0%	25%
Porcentagem de rebanhos vacinados contra HVB1, VDBV, VRSB e PI 3.	10%	25%
Porcentagem de rebanhos em que foram relatados problemas reprodutivos	100%	100%

Obs: TE = Transferência de Embriões; HVB1 = Herpesvirus bovino 1; VDBV = Vírus da diarreia bovina 1; VRSB = Vírus respiratório sincicial bovino; PI3 = Parainfluenza 3.

TABELA 5. Dados relacionados ao manejo dos rebanhos leiteiros dos tipos C e A/B estudados (expressos em % de rebanhos)

Dado pesquisado	leite tipo C	leite tipo A/B
Número de ordenhas/dia:		
Duas	100%	50%
Três	0%	50%
Ordenha mecanizada	90%	100%
Criação de bezerras:		
Individual (casinhas)	50%	75%
Coletiva	50%	25%
Criação das vacas em produção		
"Freestall"	30%	62,5%
Pasto	70%	37,5%
Trânsito de animais		
Rebanhos separados do tipo fechados	50%	0%
Trânsito intenso (exposições)	20%	50%
Alimentação de animais das faixas etárias II e III com silagem, em alguma época do ano.	100%	100%

DISCUSSÃO

Os dados apresentados mostram que o protozoário está amplamente disseminado nos rebanhos bovinos produtores de leite tipo C e de tipo A/B estudados, nos 14 municípios amostrados de Minas Gerais, entretanto, os nossos dados de sorologia apenas refletem o estado de infecção nos animais estudados.

Não houve associação significativa ($p>0,05$) entre a distribuição de animais soropositivos nas três faixas etárias estudadas nos rebanhos produtores de leite A/B e leite C. Isto significa que a frequência da infecção do parasito se distribuiu uniformemente nas três faixas etárias estudadas. Provavelmente, a infecção nesses rebanhos seja mantida por transmissão vertical, o que tem sido amplamente relatado (SCHARES *et al.*, 1998, WOUDE *et al.*, 1999a). Uma infecção pontual endêmica em todas as faixas etárias (MAINAR-JAIME *et al.*, 1999), apesar de plausível, provavelmente, seja mais remota. Se uma alta taxa de transmissão horizontal ocorre dentro de rebanhos endemicamente infectados, um aumento na prevalência com a idade deverá ser esperado (MUENCH, 1959 *Apud* DAVISON *et al.*, 1999).

Quando os dois grupos de produção foram comparados, a diferença entre a frequência de animais soropositivos para *N. caninum* foi altamente significativa ($p<0,001$), sendo maior a porcentagem de animais soropositivos nos rebanhos leiteiros do tipo A/B (Tabela 3) e isso pode ser reflexo de maior pressão produtiva nesse tipo de produção de leite.

Na faixa etária I, quando comparados os dois grupos de produção de leite, observou-se uma associação altamente significativa ($p<0,001$), sendo a frequência de soroposi-

tividade maior nos rebanhos produtores de leite A/B (Tabela 3).

Geralmente, cerca de 12,5% de um rebanho consiste de animais de até seis meses de idade e as mães destes bezerros usualmente ainda estão presentes no rebanho (DIJKSTRA *et al.*, 2001a). Apesar da importância da análise de animais com idade de até seis meses ser conhecida, principalmente no pareamento vaca-bezerro, nos estudos epidemiológicos, o teste ELISA que utilizamos não é o ideal para analisar amostras de soro dessa faixa etária. Além disso, em vários rebanhos estudados, os bezerros foram alimentados nos primeiros dias com colostro que provinha de outras vacas multíparas (bancos de colostro), que não eram necessariamente, suas próprias mães. A dificuldade em trabalhar com rebanhos de propriedade privada também se constituiu um entrave para que pudéssemos amostrar bezerros antes de ingerirem o "pool" de colostro. Por isso, optamos não incluir animais mais jovens que sete meses.

Entretanto, de acordo com os questionários, foram relatadas diferentes formas de criação de bezerras. Em 50% dos rebanhos produtores de leite tipo C as bezerras eram criadas individualmente em casinhas e nos outros 50% eram criadas coletivamente. Já nos rebanhos leiteiros do tipo A/B, em 75% as bezerras eram criadas em casinhas individuais e em 25% desses rebanhos, eram criadas coletivamente, com acesso ao pasto (Tabela 5). Não foi evidenciado se o sistema de criação das bezerras pode significativamente influenciar na aquisição de infecção pós-natal, apesar de teoricamente, as bezerras com acesso ao pasto terem maior oportunidade de se infectarem horizontalmente, quando comparados com aquelas criadas em casinhas. No grupo de rebanhos (leite C) em que as bezerras tinham maior acesso ao pasto, a frequência de infecção foi menor (Tabela 3) e nesse caso, infecções horizontais provavelmente, não sejam significativamente importantes, embora a infecção oral de bezerros foi comprovada experimentalmente pela administração oral de oocistos do parasito (DE MAREZ *et al.*, 1999).

Na faixa etária II, os dois grupos diferiram ($p<0,01$), mas em ambos os casos o modelo de criação foi o mesmo. Nos rebanhos leiteiros do tipo A/B, a frequência de soropositividade nesta faixa etária, foi quase três vezes superior à mesma faixa etária dos rebanhos leiteiros do tipo C (Tabela 3). A maior pressão produtiva (maior estresse) nos rebanhos leiteiros do tipo A/B pode ter influenciado essas taxas. Como exemplo, a idade média da novilha à primeira cria foi menor numericamente, no sistema A/B (27,4 meses) que no sistema C (33,3 meses) (Tabela 4). Ainda nesta faixa etária, segundo HIETALA & THURMOND (1999), entre 29 e 35 meses de idade, o pico de anticorpos relatado sugere uma possível associação com fatores fisiológicos ou de manejo únicos do primeiro período de lactação. A conexão en-

tre as alterações fisiológicas ou o estresse nesta faixa etária com a lactação ou a parição, tem sido pouco explorada.

Apesar da frequência de soropositividade entre as faixas etárias nos rebanhos leiteiros do tipo C não ter diferido ($P>0,05$), mais animais positivos foram observados na faixa etária III (Tabela 3). Contrariamente, no sistema de criação A/B, embora as faixas etárias também não tenham diferido ($P>0,05$), a frequência de anticorpos encontrada na faixa etária III foi a menor entre as três faixas etárias estudadas. Isto pode ser explicado pelo maior descarte de animais nesta faixa etária. Segundo WALDNER et al (1998), a maior prevalência de anticorpos em vacas mais jovens é devido ao descarte preferencial de vacas soropositivas, mais velhas, que tiveram problemas reprodutivos adversos, levando a um menor número de vacas positivas nesta faixa etária. Isto foi ratificado pelos nossos dados, como exemplo, a idade média de descarte das vacas no sistema A/B foi de nove anos, enquanto no sistema de leite C, foi numericamente superior, de 10,2 anos (Tabela 4).

Quando a faixa etária III foi comparada entre os dois sistemas de produção de leite, a frequência de soropositividade no sistema A/B diferiu ($p<0,05$) daquela encontrada no sistema de leite C, sendo 2,15 vezes superior no primeiro sistema. Fatores como uma maior pressão produtiva e maior percentagem de animais dessa faixa etária criada intensivamente e um maior número de ordenhas ao dia, provavelmente influenciaram nessa observação (Tabela 5).

O estresse é conceituado como a incapacidade de um animal interagir com o meio ambiente, um fenômeno que frequentemente manifesta-se como a falha em expressar o seu potencial genético, sendo refletido em menores taxa de crescimento, produção de leite, resistência a doenças, ou fertilidade diminuída. Dados de campo, em vacas leiteiras, mostraram que fatores estressores como a febre do leite ou claudicação, aumentaram o intervalo do parto à concepção (período de serviço) em 13-14 dias e um extra de 0,5 inseminação foi requerido por concepção (DOBSON & SMITH, 2000). O estresse imposto às vacas em produção de leite no sistema A/B parece ser bem maior do que no sistema de leite C e isto pode implicar em maiores chances de recrudescimento da infecção pelo rompimento de cistos do parasito nos animais positivos. Foi especulado que surtos de abortamentos que ocorreram em alguns rebanhos na Holanda, foram provavelmente, devido a recrudescência da infecção pelo *N. caninum*, seguida de um evento que causou imunossupressão em alguns animais (DIJKSTRA et al., 2001a, WOUDE et al., 1999a).

Nos rebanhos leiteiros do tipo A/B foi observado maior número de ordenhas ao dia e maior percentagem de vacas estabiladas. Nos rebanhos leiteiros do tipo C, uma menor percentagem das vacas em produção, era mantidas em "freestall" e nos demais rebanhos leiteiros do tipo C, após a

ordenha, as vacas em produção voltavam para o pasto, onde eram mantidas (Tabela 5). SANDERSON et al (2000), trabalhando com rebanhos de corte encontraram associação significativa ($p<0,05$) entre prevalência de vacas positivas para *N. caninum* e a densidade de vacas durante o inverno, em cinco regiões do nordeste dos EUA. Rebanhos com baixa densidade de vacas durante o inverno tinham menor proporção de vacas positivas. Ainda, o aumento da idade média de vacas no rebanho, o aumento da densidade de vacas durante o inverno e a compra de vacas foram associados ao aumento da soroprevalência para o parasito nos rebanhos ($p<0,25$). Por outro lado, o manejo de vacas em pastos foi associado à baixa prevalência de soropositividade nos rebanhos.

Apesar do sistema de leite A/B possuir um patamar de tecnificação da produção discretamente superior, como exemplos, maior porcentagem de rebanhos que utilizam inseminação artificial, relatos de já terem usado transferência de embriões e uso de ordenhadeira mecânica em 100% dos rebanhos (Tabela 4), o grau de influência destas variáveis na sorologia é incerto. Indiretamente, nesse sistema de produção de leite, existe um maior poder aquisitivo, o que provavelmente, reflete em maiores chances de aquisição de animais soropositivos para reposição nos rebanhos.

As frequências de soropositividade para *N. caninum* nos dois sistemas de produção parece não ter relação com a média de doses de sêmen por prenhez e com a taxa média de fertilidade (%), apesar dessa última ter sido discretamente maior em termos numéricos no sistema de leite A/B, bem como o intervalo de partos ter sido discretamente menor no sistema A/B (Tabela 4). STENLUND et al (1999), relataram que o número médio de inseminações em vacas naturalmente infectadas por *N. caninum* foi de 1.7 e 2.2 para as primeira e segunda gestações, respectivamente. Por outro lado, a maior preocupação com a qualidade sanitária dos animais no sistema de leite A/B, como por exemplo, um maior número de animais vacinados contra HVB1/DBV, vírus sincicial respiratório bovino e parainfluenza 3 (Tabela 4), neutralizando assim outros agentes que diminuem as taxas reprodutivas. Os rebanhos produtores de leite A/B são observados mais rigorosamente pelas autoridades sanitárias e também os animais são obrigados pela legislação a ter controle veterinário permanente. Isto pode explicar essa discreta melhor taxa de fertilidade e menor intervalo de partos nos rebanhos de leite tipo A/B. Outro fato observado foi o desconhecimento à época das coletas das amostras de informações sobre o parasito por parte dos veterinários e produtores. Os rebanhos 4 e 6 foram os que apresentaram maior grau de tecnologia para a produção, alto trânsito de animais e maior quantidade de eventos de vacinações e isso foi diretamente proporcional a frequência de anticorpos para *N. caninum* encontrada, já que foram os dois rebanhos que apresentaram maiores frequências de anticorpos para o parasito (Tabela 1).

Inclusive, o manejo nos dois rebanhos era semelhante, sendo o rebanho 6 derivado do rebanho 4 e apesar de estarem em municípios distintos, cerca de 250 km, mantiveram o mesmo padrão de distribuição de anticorpos para o parasito.

Com relação ao único rebanho negativo (Tabela 1), ele era pequeno e devido às facilidades encontradas durante a ocasião da visita à propriedade, foi amostrado grande parte do gado. O rebanho estava em formação e os animais não estavam densamente agrupados, portanto o estresse a que eram submetidos foi bem inferior que nos outros rebanhos leiteiros do tipo A/B. O título sorológico de anticorpos para *N. caninum*, varia de acordo com o estado gestacional, podendo ondular de acordo com recrudescência da infecção e/ou exposição ao parasito por infecções horizontais, chegando a declinar a um valor abaixo da sensibilidade do teste sorológico empregado em animais infectados cronicamente. Além disso, a possibilidade de animais falso-negativos não deve ser desconsiderada (PARÉ *et al.*, 1995b; HIETALA & THURMOND, 1999; STENLUND *et al.*, 1999).

Em todas as propriedades leiteiras dos tipos C e A/B, foi relatado que os animais eram alimentados em determinadas épocas do ano com silagem, principalmente de milho, nas faixas etárias II e III (Tabela 5). Em 70% dos rebanhos leiteiros do tipo C, os animais tinham acesso ao pasto e em apenas 37,5% dos rebanhos produtores de leite A/B as vacas em produção tinham acesso ao pasto (Tabela 5).

A contaminação da silagem por fungo é considerada um fator de risco potencial, porque micotoxinas podem ser produzidas e elas causam imunossupressão após repetida ingestão em baixas doses (SHARMA, 1993 *apud* BARTELS *et al.*, 1999). Tal imunossupressão pode levar à ruptura do cisto tecidual, como tem sido demonstrado em camundongos com toxoplasmose crônica (VENTURINI *et al.*, 1996 *apud* BARTELS *et al.*, 1999).

A contaminação de reservatórios de alimentos dos bovinos, como os silos, por oocistos de cães, tem sido incriminada (MCALLISTER *et al.*, 1998; HIETALA & THURMOND, 1999; BARTELS *et al.*, 1999), principalmente por atrair roedores e aves (McGUIRE *et al.*, 1999; BARTELS *et al.*, 1999) que se alimentam da silagem e isso atrai os cães e outros canídeos, prováveis hospedeiros definitivos, que defecam nas adjacências e contaminam a silagem com oocistos, expondo os bovinos à forma de transmissão horizontal. Além disso, os cães podem translocar fetos abortados, que poderão servir de alimentação a outros prováveis hospedeiros definitivos do parasito (PARÉ *et al.*, 1998).

Apesar de não ter sido possível relacionar a presença de cães nos rebanhos estudados nesse trabalho, isso tem sido amplamente relatado como fator de risco para a infecção pós-natal por *N. caninum* em rebanhos bovinos (PARÉ *et al.*, 1998; BARTELS *et al.*, 1999; WOUDE *et al.*, 1999b; DIJKSTRA *et al.*, 2001b).

A época do ano parece também ser importante na disseminação dos oocistos do parasito. O aumento da umidade relativa do ar e temperaturas ambientais mais brandas são fatores predisponentes para a sobrevivência dos oocistos em determinadas épocas do ano e subseqüentemente, maximizam a exposição horizontal de vacas ao parasito (SANDERSON *et al.*, 2000).

A procura da melhoria genética dos rebanhos também tem sido relacionada à entrada de novos agentes infecciosos, principalmente pela aquisição de novilhas para reposição (PARÉ *et al.*, 1998). Também tem sido sugerido, que *N. caninum* pode estabelecer a infecção em bovinos em um relativamente curto período de tempo, especialmente quando os animais estão sob condições estressantes como no caso de transporte e novo ambiente (SUTEERAPARP *et al.*, 1999). Em 50% dos rebanhos produtores de leite tipo A/B foi relatado trânsito intenso, onde existiam animais importados da Austrália, Canadá e E.U.A. Nos rebanhos produtores de leite tipo C, 50% eram “fechados” (Tabela 5). Entretanto em um desses rebanhos, a importação de vacas do Uruguai era constante, bem como a aquisição de animais em leilões. Em todos estes países de onde foram relatadas as importações, *N. caninum* já foi descrita (Uruguai, Austrália – BARBER *et al.*, 1997; Canadá – WALDNER *et al.*, 1998; EUA por THILSTED & DUBEY, 1989; ANDERSON *et al.*, 1991) e mesmo assim, não houve preocupação por parte dos importadores com o estado sanitário dos animais em relação a *N. caninum*, mesmo em 1996, quando começou a coleta dessas amostras e uma grande parte do mundo já estava em alerta para os potenciais riscos de prejuízos adquiridos pela aquisição de animais soropositivos (ANDERSON *et al.* 1991; DUBEY, 1999). A constante aquisição de animais soropositivos pode ser uma explicação para a frequência de infecção encontrada, bem como para a manutenção do agente, de forma vertical nos rebanhos A/B.

A totalidade dos rebanhos produtores de leite A/B era composta por animais puros da raça HPB. Nos rebanhos do sistema de leite C, a maioria dos animais era constituída por animais da raça Holandês de linhagens inferiores e em dois rebanhos, eram de outras raças com produtividade inferior. A relação entre a raça e os resultados da sorologia é incerta e não foram encontrados dados na literatura referentes aos fatores raciais relacionados com a frequência de soropositividade para *N. caninum*. Provavelmente, a maior população de animais HPB seja uma das explicações para a maior frequência encontrada nesse trabalho.

A complexa natureza de alguns fatores estressores nos modernos ambientes das fazendas atuam simultaneamente, expondo os animais aos vários estímulos diferentes (DOBSON & SMITH, 2000). Provavelmente, o maior estresse a que são submetidos os rebanhos leiteiros do tipo A/B para que expressem a sua alta produtividade, esteja no caminho inverso da fisiologia animal. É necessário conhecer mais a respeito de como

os animais respondem aos fatores estressores e como esses afetam os mecanismos que controlam as eficiências reprodutivas e produtivas dos animais (DOBSON & SMITH, 2000).

AGRADECIMENTOS

O Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) forneceu bolsa aos dois primeiros autores e a Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) financiou a coleta dos soros. Também somos gratos aos Laboratórios PFIZER Ltda – Divisão de Saúde Animal, pela doação dos “Kits” ELISA.

SUMÁRIO

Os objetivos desse trabalho foram determinar as frequências de infecção por *Neospora caninum* em dois sistemas de produção de leite em rebanhos bovinos naturalmente infectados, comparar os dois sistemas e identificar possíveis fatores predisponentes à infecção por *N. caninum* em bezerras, novilhas e vacas. Foram analisadas por um teste ELISA comercial 584 amostras de soro sanguíneo de animais pertencentes a 18 rebanhos que foram agrupados em duas categorias, de acordo com o tipo de leite produzido nas fazendas: 1) rebanhos produtores de leite tipo A/B e 2) rebanhos produtores de leite tipo C. Foram aplicados questionários aos responsáveis pelos rebanhos, visando obter informações que pudessem ajudar a esclarecer os resultados da sorologia. Foram observadas frequências diferentes ($p < 0,001$) de infecção por *N. caninum*, sendo de 27,31% (65 / 238 amostras) para o sistema leiteiro do tipo A/B e de 12,72% (44 / 346 amostras) para o sistema leiteiro do tipo C. Também houve diferença entre as mesmas faixas etárias quando comparados os dois sistemas leiteiros, mas as faixas etárias não diferiram dentro de um mesmo sistema produtivo. Fatores como trânsito de animais (compra e venda, exposições), tecnologia aplicada à produção do leite, confinamento dos animais em produção (“freestall”), entre outros, são discutidos.

PALAVRAS-CHAVE: *Neospora caninum*, bovino, fatores predisponentes, leite, anticorpos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, M.L., ANDRIANARIVO, A.G. & CONRAD, P.A. (2000). Neosporosis in cattle. *Animal Reproduction Science*, 60:417-431.
- ANDERSON, M.L., BLANCHARD, P.C. & BARR, B.C. (1991). *Neospora*-like protozoan infections as a major cause of abortion in California dairy cattle. *Journal American Veterinary Medical Association*, 198:241-244.
- BARBER, J.S., GASSER, R.B., ELLIS, J., REICHEL, M.P., McMILLAN, D. & TREES, A.J. (1997). Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in different canids populations. *Journal of Parasitology*, 83:1056-1058.
- BARTELS, C.J.M., WOUDA, W. & SCHUKKEN, Y.H. (1999). Risk factors for *Neospora caninum* associated abortion storms in dairy herds in The Netherlands (1975-1997). *Theriogenology*, 52:247-252.
- DAVISON, H.C., FRENCH, N.P. & TREES, A.J. (1999). Herd-specific and age-specific seroprevalence of *Neospora caninum* in 14 British dairy herds. *Veterinary Record*, 144:547-550.
- DE MAREZ, T. LIDDEL, S., DUBEY, J.P., JENKINS, M.C. & GASBARRE, L. (1999). Oral infection of calves with *Neospora caninum* oocysts from dogs: humoral and cellular immune responses. *International Journal for Parasitology*, 29:1647-1657.
- DEAN, A.G., DEAN, J.A., COULOMBIER, D. & BRENDEN, K.A. (1994). Epi Info. Version 6: a word processing database, and statistics program for epidemiology on microcomputers. *Centers of Disease Control and Prevention*. Atlanta, Georgia, USA. 589p.
- DJIKSTRA, Th., BARKEMA, H.W., EYSKER, M. & WOUDA, W. (2001a). Evidence of post-natal transmission of *Neospora caninum* in Dutch dairy herds. *International Journal for Parasitology*, 31:209-215.
- DJIKSTRA, Th., EYSKER, M., SHARES, G., CONRATHS, F.J., WOUDA, W. & BARKEMA, H.W. (2001b). Dogs shed *Neospora caninum* oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrums spiked with *Neospora caninum* tachyzoites. *International Journal for Parasitology*, 31:747-752.
- DOBSON, H. & SMITH, R.F. (2000). What is stress, and how does it affect reproduction. *Animal Reproduction Science*, 60-61:743-752.
- DUBEY, J.P. (1999). Recent advances in *Neospora* and neosporosis. *Veterinary Parasitology*, 84:349-367.
- GONDIM, L.F.P., SARTOR, I.F., HASEGAWA, H. & YAMANE, I. (1999). Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in Bahia, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v.86, p. 71-75, 1999.
- HIETALA, S.K., THURMOND, M.C. Postnatal *Neospora caninum* transmission and transient serologic responses in two dairies. *International Journal for Parasitology*, 29:1669-1676.
- MAINAR-JAIME, R.C., THURMOND, M.C., BERZAL-HERRANZ, B. & HIETALA, S.K. (1999). Seroprevalence

- of *Neospora caninum* and abortion in dairy cows in northern Spain. *Veterinary Record*, 145:72-75.
- McALLISTER, M.M., DUBEY, J.P., LINDSAY, D., JOLLEY, W., WILLS, R. & McGUIRE A.M. (1998). Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology*, 28:1473-1478.
- McGUIRE, A.M., McALLISTER, M.M., WILLS, R. A. & TRANAS, J.D. (1999). Experimental inoculation of domestic pigeons (*Columbia livia*) and zebra finches (*Pophila guttata*) with *Neospora caninum* tachyzoites. *International Journal for Parasitology*, v.29, p.1525-1529, 1999.
- MELO, C.B. & LEITE, R.C. (1999). *Neospora caninum* em Minas Gerais: dados preliminares. XI Seminário Brasileiro de Parasitologia Veterinária, Salvador, Bahia, 24-28 de outubro de 1999, p.255-256.
- MELO, C.B., LEITE, R.C., COUTO, I.P. & LEITE, R.C. (2001). *Neospora caninum*: distribuição de anticorpos em três faixas etárias de rebanhos bovinos de leite em Minas Gerais. *Revista Brasileira de Reprodução animal*, 25(2):250-252.
- PARÉ, J., THURMOND, M.C. & HIETALA, S.K. (1995b). Interpretation of an indirect fluorescent antibody test for diagnosis of *Neospora* sp. infection in cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 7:273-275.
- PARÉ, J., FECTEAU, G., FORTIN, M. & MARSOLAIS, G. (1998). Seroepidemiologic study of *Neospora caninum* in dairy herds. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 213(11):1595-1598.
- PARÉ, J., HIETALA, S.K. & THURMOND, M.C. (1995a). An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for serological diagnosis of *Neospora* sp. infection in cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 7:352-359.
- PFEIFFER, D.U., WILLIANS, N.B. & THORNTON, R.N. (1997). A simple spreadsheet simulation model of the economics effects of *Neospora caninum* abortions in dairy cattle in New Zealand. *Proceedings of 8th Symposium of the International Society for Veterinary Epidemiology and Economics*, Paris, France, July 8-11, 1997. Special Issue of Epidemiologie et santé animale, 31-32(10):12-3.
- SANDERSON, M.W., GAY, J.M. & BAZLER, T.V. (2000). *Neospora caninum* seroprevalence and associated risk factors in beef cattle in the northwestern United States. *Veterinary Parasitology*, 90: 15-24.
- SAMPAIO, I.M.B. (1998). Estatística aplicada à experimentação animal. Belo Horizonte. *Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia*, 221p.
- SCHARES, G., PETERS, M., WURM, R., BÄRWALD, A. & CONRATHS, F.J. (1998). The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analysed by serological techniques. *Veterinary Parasitology*, 80: 87-98.
- STENLUND, S., KINDAHL, H. MAGNUSSON, U., UGGLA, A. & BJÖRKMAN, C. (1999). Serum antibody profile and reproductive performance during two consecutive pregnancies of cows naturally infected with *Neospora caninum*. *Veterinary Parasitology*, 85:227-234.
- SUTEERAPARP, P., PHOLPARK, S., PHOLPARK, M., CHAROENCHAI, A., CHOMPOOCHAN, T., YAMANE, I. & KASHIWAZAKI, Y. (1999). Seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* and associated abortion in dairy cattle from central Thailand. *Veterinary Parasitology*, 86:49-57.
- THILSTED, J.P. & DUBEY, J.P. (1989). Neosporosis –like abortion in a herd of dairy cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 1:205-209.
- WALDNER, C.L., JANZEN, E.D. & RIBBLE, C.S. (1998). Determination of the association between *Neospora caninum* infection and reproductive performance in beef herds. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 213:685-690.
- WOUDA, W., BARTELS, C.J.M. & MOEN, A.R. (1999a). Characteristics of *Neospora caninum*-associated abortion storms dairy herds in The Netherlands (1995 to 1997). *Theriogenology*, 52: 233-245.
- WOUDA, W., BRINKHOF, J.M.A., van MAANEN, C., de GEE, A.L.W. & MOEN, A.R. (1998). Serodiagnosis of neosporosis in individual cows and dairy herds, a comparative study of three enzyme-linked immunosorbent assays. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*, 5:711-716.
- WOUDA, W., DIJKSTRA, Th, KRAMER, A.M.H., van MAANEN, C. & BRINKHOF, J.M.A. (1999b). Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infection in dogs and cattle. *International Journal for Parasitology*, 29:1677-1682.