

CRISTIANO BARROS DE MELO

T 636.052 69

M 5252

2001

FATORES QUE INTERFEREM NA NEOSPOROSE EM MINAS GERAIS

Tese apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva.

Orientador: Prof. Romário Cerqueira Leite.

Belo Horizonte
UFMG – Escola de Veterinária
2001

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

07/03/02

38202-07

0325 - 3560

M528f Melo, Cristiano Barros de, 1969-

2001 Fatores que interferem na neosporose em Minas Gerais / Cristiano Barros de Melo. – Belo Horizonte: UFMG -Escola de veterinária, 2001.

87p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária

1. Bovino de leite – Doenças – Teses. 2. Doenças parasitárias em animais – Teses. 3. Neosporose em bovino – Teses. I. Título.

CDD – 636.214 089 69

Tese defendida em 17 de dezembro de 2001 e aprovada pela comissão examinadora
constituída pelos professores:



A handwritten signature in black ink, appearing to read "Romário Cerqueira Leite".

Prof. Dr. Romário Cerqueira Leite
(Orientador)

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Rômulo Cerqueira Leite".

Prof. Dr. Rômulo Cerqueira Leite

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Carlos Wilson Gomes Lopes".

Prof. Dr. Carlos Wilson Gomes Lopes

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Amália Verônica M. da Silva".

Profa. Dra. Amália Verônica Mendes da Siva

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Múcio Flávio Barbosa Ribeiro".

Prof. Dr. Múcio Flávio Barbosa Ribeiro

Ao meu pai Jurandir, que priorizou o estudo dos filhos, na certeza de um futuro melhor.

À minha mãe Tereza, que me criou com carinho e alegria.

À minha irmã Tereza de Lisieux, que é o complemento final de uma família maravilhosa, da qual me orgulho de fazer parte.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Romário Cerqueira Leite, pela orientação, confiança e amizade demonstradas durante esse tempo de convivência, em que tive total liberdade para desenvolver e expressar as minhas idéias.

Ao Professor Rômulo Cerqueira Leite, por ter acreditado desde o início no meu potencial e ter me aberto as portas em várias oportunidades; também, por ter me dado a idéia de trabalhar com *Neospora*, em 1999.

Ao Professor Carlos Wilson G. Lopes, pelas sugestões e pelos ensinamentos e experiência que me passou durante algumas ocasiões em que tive a oportunidade de ouvi-lo.

À minha grande amiga Amália Verônica Mendes da Silva, por ter me apresentado alguns anos atrás, com grande experiência e alegria, uma parasitologia aplicável e fascinante.

Ao Professor Múcio Ribeiro, pelas sugestões por ocasião da defesa deste trabalho.

Aos estagiários e bolsistas Isabella Pinheiro do Couto, Érika Milhomens Brescia e Gustavo Fontes Paz, pelo auxílio de todas as horas.

Ao Luis Fernando Pita Gondim, pelas várias oportunidades de aprender e discutir sobre vários aspectos relacionados a *N. caninum*; ao Dr. Milton M. McAllister (University of Illinois), pelos ensinamentos e por ter, gentilmente, cedido as cepas "Beef" e "Illinois" de *N. caninum* e grande quantidade de material didático; e ao Alexandre M. Pinheiro, pela colaboração na sorologia dos cães.

À Professora Zélia Inês Portela Lobato, pelo apoio necessário, inclusive disponibilizando o seu Laboratório de Virologia para a realização dos testes ELISA e do cultivo celular das cepas de *N. caninum*.

Aos meus colegas Guilherme Nunes de Souza e Marcelo Fernandes Camargos, pelos auxílios incondicionais nas análises epidemiológicas e estatísticas.

Ao meu colega Marcos Horácio Rostagno, pela gentileza de ter-me facilitado a aquisição de alguns reagentes importados durante a sua permanência nos Estados Unidos.

Ao Professor Rogério Marcos de Souza, por ter cedido os casais de gerbils reprodutores e assessorado na criação desses animais.

Aos meus colegas de pós-graduação Fabiano Sant'Anna, pelo auxílio na histopatologia, e César Augusto López Aguilar, pela ajuda na língua espanhola; ao meu amigo Felipe S. Cerqueira Leite, pelo auxílio na língua inglesa.

À Doracy de Fátima (E.V. – UFMG) e Jaqueline (LARA – M.A. – PL), pelo apoio no cultivo celular.

À Aryane Machado Siqueira (IBAMA), por permitir o trabalho com os cachorros-do-mato e ao Otávio Borges Maia, por ter cedido as amostras dos lobos-guarás.

Aos meus colegas de pós-graduação Aiesca Oliveira Pellegrin, Geder Paulo Herrmann, Ricardo Henriques de Miranda Leite, Paola Snoeck, Geraldo Sérgio Barbosa, Júnia Cordeiro Barbosa, Maria da Glória Quintão, Fernando Leandro, Roberto Paixão, Patrícia Macêdo, Simone Renault, Anapolino Macêdo, Manoel Dantas, Valéria Sá Jaime, Hélio, Alexandre Munhoz, George Rego, Ronnie Antunes e todos aqueles com quem eu tive a satisfação de conviver durante a minha estada em Belo Horizonte.

Aos meus colegas de pós-graduação Paulo Artur Konrad, Daniel Roulim Stainki e Rogério Oliveira Rodrigues, pelo excelente convívio e, principalmente, pelas horas de descontração no “Condomínio Daniela”.

À família Cerqueira Leite, em especial a Suely, Luisa e Felipe, por me tornarem uma “pessoa de casa”.

Aos Laboratórios Pfizer – Divisão de Saúde Animal, pela doação dos “kits” ELISA.

À Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte, por ter cedido, gentilmente, as fotos do lobo-guará e do cachorro-do-mato, que ilustram esta tese.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão do primeiro ano de bolsa e por ter financiado a coleta das amostras de sangue dos bovinos estudados; ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa que recebi nos anos seguintes do curso.

À Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia (FEP – MVZ) - Coordenação preventiva, por ter financiado a compra de reagentes e material de consumo utilizados nos experimentos.

Aos funcionários, professores e amigos da Escola de Veterinária da UFMG, pelo convívio durante esses anos de pesquisas.

Aos proprietários, responsáveis e tratadores dos rebanhos estudados, pela disponibilidade em tudo o que foi necessário durante a coleta dos dados nas fazendas.

Ao povo brasileiro, que, por intermédio das fundações de fomento à pesquisa, financiou este trabalho com os inúmeros impostos que é obrigado a pagar.

“Saber que se sabe o que se sabe e saber que não se sabe o que não se sabe; eis a verdadeira ciência.”

Confúcio

SUMÁRIO

	Página
PREFÁCIO	11
RESUMO	12
ABSTRACT	13
RESUMEN	13
CAPÍTULO I. Introdução, justificativa e objetivos.	14
CAPÍTULO II. <i>Neospora caninum</i> - Distribuição de anticorpos em três faixas etárias de rebanhos bovinos leiteiros em Minas Gerais.	22
CAPÍTULO III. Freqüência de infecção por <i>Neospora caninum</i> em dois diferentes sistemas de produção de leite e fatores predisponentes à infecção em bovinos em Minas Gerais.	25
CAPÍTULO IV. Infecção por <i>Neospora caninum</i> associada às infecções pelos herpes-vírus bovino I e vírus da diarreia bovina a vírus em bovinos em Minas Gerais.	35
CAPÍTULO V. Sorologia para <i>Neospora caninum</i> em canídeos silvestres sul-americanos.	42
CAPÍTULO VI. Considerações finais e referências bibliográficas.	45
ANEXOS	55
ANEXO I. Resumos relacionados a <i>Neospora caninum</i> publicados em congressos (1999 - 2001).	55
ANEXO II. PRANCHAS.	64
PRANCHA I. Diagnóstico da infecção por <i>Neospora caninum</i> .	67
PRANCHA II. Aspectos do trabalho realizado com os canídeos descritos no CAPÍTULO V.	71
PRANCHA III. Infecção experimental com a cepa de <i>N. caninum</i> "Illinois" e alterações clínicas observadas em gerbils.	75
PRANCHA IV. Tentativa de isolamento de oocistos de <i>N. caninum</i> de cães inoculados com tecido nervoso de vacas naturalmente soropositivas para o parasito.	79
PRANCHA V. Cultivo <i>in vitro</i> das cepas Beef e Illinois em células VERO.	83
ANEXO III. Questionário aplicado aos responsáveis pelos rebanhos estudados.	85
ANEXO IV. Localização dos municípios amostrados em Minas Gerais onde estavam inseridos os rebanhos bovinos analisados.	87

LISTA DE QUADROS

	Página
QUADRO 1 Algumas espécies animais infectadas por <i>N. caninum</i> e referências	15
QUADRO 2 Freqüência de infecção por <i>N. caninum</i> em cães em algumas regiões estudadas	17
QUADRO 3 Freqüência de infecção por <i>N. caninum</i> em bovinos em algumas regiões estudadas e referências	18

LISTA DE TABELAS

		Página
TABELA 1	Total de amostras analisadas, porcentagem de positivas para <i>Neospora caninum</i> e municípios de localização dos rebanhos estudados	26
TABELA 2	População total estudada por tipo de leite produzido e faixa etária, amostras necessárias e amostras coletadas na amostragem aleatória estratificada	27
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	28
TABELA 4	Dados produtivos e reprodutivos médios dos rebanhos leiteiros dos tipos C e A/B	29
TABELA 5	Dados relacionados ao manejo dos rebanhos leiteiros dos tipos C e A/B estudados (expressos em % de rebanhos)	29
TABELA 6	Quantidade de amostras testadas, amostras positivas e porcentagem de positivas para os três agentes infecciosos observados individualmente em cada rebanho do grupo I	37
TABELA 7	Comparação entre a quantidade de amostras soropositivas para <i>N. caninum</i> e a quantidade de amostras soropositivas de forma associada por dois ou mais agentes infecciosos nos rebanhos do grupo I	38
TABELA 8	Quantidade de amostras testadas, amostras positivas e porcentagem de positivas para os três agentes infecciosos observados individualmente em cada rebanho do grupo II	38
TABELA 9	Comparação entre a quantidade de amostras positivas para <i>N. caninum</i> e a quantidade de amostras positivas de forma associada por dois ou mais agentes infecciosos nos rebanhos do grupo II	38

LISTA DE FIGURAS

		Página
FIGURA 1	Placas e reagentes que compõem o "kit" ELISA (IDEXX Laboratories, USA)	67
FIGURA 2	Leitora automática de placas Labsystems Multiskan MS (Finland)	67
FIGURA 3	Bezerra com baixo peso e apresentando fraco desenvolvimento (seta) em comparação com outra da mesma idade, em um rebanho soropositivo para <i>N. caninum</i> , no Município de Lavras, MG.	67
FIGURA 4	Feto abortado aos oito meses de idade, no qual foi detectado infecção por <i>N. caninum</i> , pelo encontro de anticorpos para o parasito no fluido peritonial, pelo teste ELISA	67
FIGURA 5	A artrogripose tem sido relatada como consequência de infecção por <i>N. caninum</i> . Na foto, artrogripose em um bezerro Brahmam.	67
FIGURA 6	O lobo-guará (<i>Chrysocyon brachyurus</i>) (Illiger, 1811) (foto: gentileza da Fundação Zôo-Botânica de Belo Horizonte)	71
FIGURA 7	O cachorro-do-mato (<i>Cerdocyon thous</i>), (Linnaeus, 1758)	71
FIGURA 8	Lâmina para imunofluorescência usada na detecção de infecção por <i>N. caninum</i> nos canídeos estudados (VMRD).	71
FIGURA 9	Lâminas prontas para leitura (VMRD).	71

FIGURA 10	Reagentes utilizados para imunofluorescência (VMRD).	71
FIGURAS 11, 12 E 13	Aspectos da coleta de sangue nos cachorros-do-mato estudados.	71
FIGURA 14	Gerbils em condições normais. Observar o aspecto de curiosidade e a postura dos animais.	75
FIGURA 15	Inoculação intraperitoneal de um gerbil com uma suspensão de taquizoítos da cepa Illinois em meio de cultura (Meio Essencial Mínimo – MEM).	75
FIGURA 16	Gerbils após seis dias de inoculação e um controle (seta). Observar o comportamento dos animais inoculados, amontoados no canto da caixa. O controle se manteve sem alterações clínicas.	75
FIGURA 17	Outro aspecto dos animais inoculados da Figura 16. Observar o eriçamento dos pêlos dos animais inoculados (setas).	75
FIGURA 18	Gerbil paraplégico após 14 dias de inoculação da cepa de <i>N. caninum</i> Illinois. O animal permaneceu vivo por 32 dias, quando foi sacrificado. Observar a ausência de propriocepção do membro posterior direito.	75
FIGURA 19	Mesmo animal da Figura 18, com flacidez da cauda, arrepimento e emagrecimento.	75
FIGURA 20	Comparação entre o gerbil inoculado da Figura 18 (seta) e um irmão de ninhada não-inoculado. Observar o emagrecimento e a diferença de tamanho dos animais.	75
FIGURA 21	Gerbil sacrificado, momentos antes de ser necropsiado.	75
FIGURAS 22 E 23	Cadela e ninhada utilizadas no estudo. Os filhotes nasceram no infectório, e todos foram soronegativos para o parasito antes da inoculação com o tecido nervoso das vacas.	79
FIGURA 24	Cabeça de uma das vacas soropositivas no teste ELISA.	79
FIGURAS 25 E 26	Coleta do cérebro e cerebelo das vacas	79
FIGURA 27	As amostras dos tecidos nervosos foram cortadas em pedaços para inoculação oral dos cães.	79
FIGURAS 28 E 29	Inoculação oral dos cães com o tecido nervoso das vacas soropositivas.	79
FIGURA 30	Garrafas A25 originalmente recebidas com as cepas de <i>N. caninum</i> Beef e Illinois em 3 de setembro de 2000, como cortesia do Dr. Milton M. McAllister (University of Illinois, Urbana, Illinois, USA).	83
FIGURA 31	Monocamada íntegra de células VERO (ATCC CCL-81) preparada para a sétima passagem dos taquizoítos de <i>N. caninum</i> .	83
FIGURA 32	Efeito citopático causado pela cepa Beef, após seis dias de inoculação em células VERO.	83
FIGURA 33	Efeito citopático causado pela cepa Illinois, após cinco dias de inoculação em células VERO.	83
FIGURA 34	Municípios em Minas Gerais onde estavam localizados os rebanhos bovinos analisados nos Capítulos II, III e IV (por mesorregião).	87

PREFÁCIO

CAPÍTULO I - Introdução, justificativa e objetivos

Neste capítulo é feita uma introdução geral, e a literatura pertinente ao assunto é revista em forma de atualização. São relacionados tópicos sobre a descoberta do protozoário, o caráter histórico dessa infecção em cães, bovinos e outras espécies - incluindo o homem, a classificação taxonômica, os conhecimentos atuais do ciclo de vida do parasito, a neosporose em cães e em bovinos, o impacto econômico da doença na bovinocultura, o histórico da neosporose no Brasil e a profilaxia e controle da infecção. Também são apresentados as justificativas e os objetivos deste projeto.

CAPÍTULO II - *Neospora caninum* - Distribuição de anticorpos em três faixas etárias de rebanhos bovinos leiteiros em Minas Gerais

Foi estudada a distribuição de anticorpos para *N. caninum* em 18 rebanhos de bovinos leiteiros em Minas Gerais. Para isso, 584 soros foram alocados em três faixas etárias (7 a 18 meses, 19 a 30 meses e vacas ≥ 31 meses de idade). Um ELISA indireto comercial foi utilizado nas análises, que revelaram 109 animais positivos (18,66%), sendo 17,94; 20,63; e 18,18%, respectivamente, para a primeira, segunda e terceira faixas etárias. Esses resultados não diferiram entre si ($P > 0,05$), sendo discutidos fatores como a presença de cães junto com os rebanhos, a forma de transmissão e a necessidade de avaliar os custos da infecção nos rebanhos leiteiros em Minas Gerais.

CAPÍTULO III - Frequência de infecção por *Neospora caninum* em dois diferentes sistemas de produção de leite e fatores predisponentes à infecção em bovinos em Minas Gerais

Neste capítulo foram determinadas as frequências de infecção por *N. caninum* nos sistemas de produção de leite dos tipos A/B e C em rebanhos bovinos infectados naturalmente. Possíveis fatores predisponentes à infecção por *N. caninum* foram analisados pela associação da sorologia (ELISA) em 584 amostras de soro sanguíneo de vacas com respostas de questionários aplicados aos responsáveis pelos rebanhos. Os rebanhos foram agrupados em duas categorias, de acordo com o tipo de leite produzido nas fazendas: 1) rebanhos produtores de leite do tipo A/B e 2) rebanhos produtores de leite do tipo C. Fatores como trânsito de animais (compra e venda, exposições), tecnologia aplicada à produção do leite e confinamento dos animais em produção ("freestall"), entre outros, são discutidos.

CAPÍTULO IV - Infecção por *Neospora caninum* associada às infecções causadas pelos herpes-vírus bovino 1 e vírus da diarreia bovina a vírus em bovinos em Minas Gerais

Foi analisada a frequência de infecção por *N. caninum* associada às infecções pelos HVBI e VDBV em dois grupos de rebanhos: no grupo I, foram analisados 15 rebanhos leiteiros (476 amostras de soro sanguíneo) naturalmente infectados pelos três agentes infecciosos. No grupo II foram analisados três rebanhos leiteiros (100 amostras de soro sanguíneo) de vacas vacinadas contra esses dois vírus, para que fosse determinada a prevalência da infecção por *N. caninum*. São, também, apresentadas considerações a respeito das associações entre os patógenos.

CAPÍTULO V - Sorologia para *Neospora caninum* em canídeos silvestres sul-americanos

Foram pesquisados anticorpos para *N. caninum* em amostras de soro de canídeos sul-americanos, por imunofluorescência indireta (IFI). As amostras foram coletadas em 48 lobos-guarás (*Chrysocyon brachyurus*) provenientes de zoológicos e de vida livre e em dois cachorros-do-mato (*Cerdocyon thous*). Anticorpos para *N. caninum* não foram detectados nas amostras testadas.

CAPÍTULO VI - Considerações finais e referências bibliográficas

Neste capítulo são discutidos fatores de relevância na questão da neosporose em Minas Gerais, como a importância da doença nos bovinos do estado, a importância da fauna silvestre na manutenção do parasito como reservatório e a necessidade do estabelecimento de técnicas diagnósticas acessíveis. Após esses comentários, são apresentadas todas as referências bibliográficas citadas no corpo da tese.

ANEXOS - Resumos publicados em congressos, pranchas coloridas e municípios em Minas Gerais onde estavam localizados os rebanhos bovinos analisados.

ANEXO I - Resumos relacionados a *Neospora caninum* publicados em congressos no período de 1999 a 2001

ANEXO II - Pranchas - Coleção de fotos dos experimentos realizados

ANEXO III - Questionário aplicado aos responsáveis pelos rebanhos estudados

ANEXO IV - Localização dos municípios amostrados em Minas Gerais onde estavam inseridos os rebanhos bovinos analisados

RESUMO

Características epidemiológicas de *Neospora caninum* (Apicomplexa: Toxoplasmatinae) foram pesquisadas em rebanhos bovinos leiteiros em Minas Gerais, por um teste ELISA indireto comercial e por questionários submetidos aos responsáveis pelos rebanhos amostrados, à época da coleta das amostras de sangue dos animais, em 1997. Os dados obtidos pela sorologia foram correlacionados com as respostas dos questionários, com o objetivo de determinar a frequência de infecção em rebanhos produtores de leite tipos C e A/B, observando-se fatores que pudessem predispor a infecção pelo parasito. Ainda, a infecção pelo *N. caninum* foi correlacionada com infecções causadas pelo vírus HVB 1 e pelo vírus da DBV, e a prevalência de infecção pelo parasito foi determinada em vacas leiteiras vacinadas contra esses dois agentes virais. Outras pesquisas foram realizadas, como a busca de outros hospedeiros canídeos para o parasito, em que foram testados por um teste de imunofluorescência indireta comercial, soros de lobos-guarás (*Chrysocyon brachyurus*) e de cachorros-do-mato (*Cerdocyon thous*), infecção em gerbils (*Meriones unguiculatus*), objetivando estudar clinicamente a neosporose, manutenção de taquizoítos de *N. caninum in vivo* e manutenção desses taquizoítos em monocamadas de células VERO. Além disso, foi feita a infecção oral de cães previamente soronegativos para o parasito com tecidos nervosos de vacas soropositivas para *N. caninum* e com um sólido histórico de abortamentos, na tentativa de isolamento de oocistos nas fezes de cães.

Palavras-chave: *Neospora caninum*, bovino, infecção, anticorpo, neosporose, lobo-guará e cachorro-do-mato.

ABSTRACT

Epidemiological features of *Neospora caninum* (Apicomplexa: Toxoplasmatinae) have been studied in milk cattle herds in Minas Gerais by both using a commercial indirect ELISA kit and by submitting questionnaires to the studied herds managers by the time the animals' blood samples were collected, in 1997. The data obtained by serology was compared to the questionnaires answers aiming to identify predicting factors of infection occurrence in type C, A and B milk producing herds. It was also studied the relation between *N. caninum* and the viruses HVB 1 and BVD and the prevalence of the parasite infection in milk producing cows vaccinated against these two viral species. It has also been carried out other relevant studies such as the search of other canids which might be natural hosts to the parasite, testing serum of crab-eating foxes (*Cerdocyon thous*), and maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) using a commercial indirect immunofluorescence kit; Gerbils (*Meriones unguiculatus*) have been experimentally infected in order to study neosporosis' symptomatology; *N. caninum* in tachyzoite stage has been kept *in vivo* in VERO cells monolayers; and oral infection was done in serologically negative dogs by using brain tissue samples from positive cattle from a high abortion prevalence herds for isolate oocysts shed by these dogs.

Keywords: *Neospora caninum*, cattle, infection, antibody, neosporosis, maned wolf, crab-eating fox.

RESUMEN

Fueron evaluadas las características epidemiológicas del *Neospora caninum* (Apicomplexa: Toxoplasmatinae) en rebaños de vacas lecheras en Minas Gerais usando una prueba de ELISA indirecta y mediante encuestas técnicas realizadas a los responsables por dichos rebaños. La recolección de muestras de sangre fue realizada en 1997. Los resultados obtenidos fueron comparados con las respuestas de las encuestas con el objetivo de determinar la frecuencia de la infección en rebaños productores de leche tipo C y tipo A/B, observando factores predisponentes de la infección parasitaria. Además, la infección por el *N. caninum* fue correlacionada con las infecciones causadas por los virus HVB, DBV y la prevalencia de infección parasitaria fue determinada en vacas lecheras vacunadas contra esos dos agentes virales. Otras investigaciones, como la búsqueda de otros hospederos canídeos para el parásito, evaluados por análisis de inmunofluorescencia indirecta, incluyeron, sueros de lobos-guará (*Chrysocyon brachyurus*) y de zorros (*Cerdocyon thous*), infección de gerbils (*Meriones unguiculatus*), con el objetivo de estudiar clínicamente la neosporosis, mantenimiento de taquizoitos de *N. caninum* *in vivo* y mantenimiento de estos taquizoitos en un estrato de células VERO. Además de esto se realizó la infección oral de perros seronegativos con tejidos nerviosos de vacas seropositivas para el *N. caninum* y con precedentes de abortos en un intento de aislar oocistos en las heces de perros.

Palabras clave: *Neospora caninum*, ganado vacuno, infección, anticuerpo, neosporosis, lobo guará, zorro.

INTRODUÇÃO, JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

INTRODUÇÃO

DESCOBERTA DE *Neospora caninum*

O relato inicial de um esporozoário formador de cistos foi feito na Noruega por Bjerkås et al. (1984), quando encontraram um parasito coccídeo como causador de meningo-encefalite e miosite em uma ninhada de cães da raça bóxer. Ao microscópio óptico, o parasito lembrava o *Toxoplasma gondii*, mas não reagia imunohistoquimicamente com anticorpos anti *T. gondii*. Estudos ultra-estruturais posteriores indicaram que esse parasito era diferente de outros protozoários conhecidos.

Enquanto revisava a literatura proposta para um livro sobre toxoplasmose em animais e no homem, J.P. Dubey, um pesquisador do USDA, encontrou o relato em que Bjerkås et al. (1984) tinham encontrado um parasito semelhante ao *T. gondii* em tecidos de cães paráliticos, na Noruega. O organismo não era infectivo para camundongos, e os cães não tinham anticorpos para o *T. gondii*. Dr. Dubey decidiu, então, rever o "status" da toxoplasmose em cães. Em colaboração com o Dr. James Carpenter, do Angell Memorial Animal Hospital, Massachussets, secções de tecidos e históricos de todos os cães que tinham morrido de infecções semelhantes à toxoplasmose de 1952 a 1987 nesse hospital foram revistas. Após rever todas as secções e algumas repetidamente, o Dr. Dubey ficou intrigado com o fato de que os taquizoítos do *T. gondii* e do novo parasito canino eram morfológicamente similares. Eventualmente, ele associou cistos teciduais que tinham uma grossa parede e eram encontrados apenas no sistema nervoso central com os taquizoítos, e isso o ajudou a relatar um novo parasito,

denominando um novo gênero, *Neospora*, com a *N. caninum* como espécie-tipo (Dubey et al., 1988a). Tecidos de gatos que morreram no Angell Memorial Animal Hospital, Massachussets, nos últimos 40 anos também foram examinados, não sendo encontrado nenhum caso relacionado a *N. caninum*.

Após seis meses da descrição de *Neospora* surgiu uma oportunidade para que o parasito fosse cultivado de tecidos de cães paráliticos. Após a necropsia em filhotes de cães com paresia de posteriores e meticulosa dissecação dos nervos espinhais, sucedeu-se o crescimento do parasito em cultivo celular. Esse parasito não foi diferenciado do *T. gondii* até que a parede do cisto tecidual, encontrada em camundongos inoculados com o cultivo celular infectado, fosse mensurada. Dentro de pouco tempo, antisoro contra *N. caninum* foi produzido em coelhos, e um teste imunohistoquímico foi desenvolvido para separar *N. caninum* e *T. gondii*. Assim, os postulados de Koch foram completamente preenchidos, (Dubey et al., 1988b; Lindsay & Dubey, 1989; Dubey, 1996).

DIAGNÓSTICO DE *Neospora caninum* EM BOVINOS

Desde a metade dos anos 80, abortamentos causados por protozoários em bovinos eram observados por pesquisadores da Califórnia, que relataram em fetos bovinos encefalite necrosante multifocal não supurativa semelhante à encefalite causada pelo *T. gondii* em fetos de ovinos. Além disso, esses fetos também tinham miocardite não supurativa e infiltrados focais não supurativos em vários outros órgãos, como

músculo, fígado, pulmão, rim e placenta. Parasitos eram vistos quase sempre como cistos teciduais no parênquima cerebral em um pequeno número de fetos. Em apenas uma, de um total de 44 amostras de fluidos fetais examinados, títulos de anticorpos para *T. gondii* foram encontrados (Anderson et al., 1990; Barr et al., 1990).

No Novo México, Thisted & Dubey (1989) relataram lesões similares em sete de nove fetos provenientes de um rebanho bovino leiteiro com histórico de abortamentos persistentes, durante um período de cinco meses. O protozoário que foi visto em dois fetos reagiu imuno-histoquimicamente com anticorpos específicos para *N. caninum* que foram produzidos com amostras do parasito canino. Posteriormente, pesquisadores,

usando um anti-soro específico para *N. caninum* (Lindsay & Dubey, 1989), constataram que um protozoário semelhante a *Neospora* foi a principal causa de abortamentos em bovinos leiteiros na Califórnia (Anderson et al., 1991).

Neospora caninum EM OUTRAS ESPÉCIES ANIMAIS

O parasito tem sido relatado em outras espécies animais domésticas e selvagens, infectados natural ou experimentalmente, mas apenas como hospedeiro intermediário, à exceção do cão. No Quadro 1 estão relacionadas as referências disponíveis, em que a infecção por *N. caninum* foi relatada em determinadas espécies.

Quadro 1 - Algumas espécies animais infectadas por *N. caninum* e referências

Espécie	Referência
Cães	McAllister et al. (1998a), Sawada et al. (1998), Lindsay et al. (1999) e Mineo et al. (2001)
Bovinos	Thielsted & Dubey (1989), Dubey & Lindsay (1996) e Anderson et al. (2000)
Ovinos	Dubey et al. (1990) e McAllister et al. (1996)
Caprinos	Barr et al. (1992) e Dubey et al. (1996b)
Eqüinos	Dubey & Porterfield (1990), Marsh et al. (1996) e Hamir et al. (1999)
Cervos	Woods et al. (1994) e Peters et al. (2001)
Coiotos	Lindsay et al. (1996)
Raposas	Barber et al. (1997), Simpson et al. (1997) e Lindsay et al. (2001)
Dingos	Barber et al. (1997)
Búfalos	Fuji et al. (2001) e Guarino et al. (2000)
Camundongos	Lindsay & Dubey (1990a)
Gatos	Dubey & Lindsay (1989) e McAllister et al. (1998b)
Ratos	Lindsay & Dubey (1990b)
Macacos	Barr et al. (1994)
Gerbils	Gondim et al. (1999a)
Mustelídeos	McAllister et al. (1999)
Pássaros	McGuire et al. (1999)
Camelos	Hilali et al. (1998)
Suínos	Jensen et al. (1998)

Neospora caninum NO HOMEM

Não foram encontradas evidências de que o parasito seja responsável por doença e que consiga causar infecção em humanos (Petersen et al., 1999; Graham et al., 1999).

CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DE *Neospora caninum*

De acordo com Current et al. (1990) e Cavalier-Smith (1993), a classificação taxonômica de *N. caninum* é a seguinte:

Império – Eukariota.

Reino – Protozoa (Owen, 1858).

Filo – Apicomplexa (Levine, 1970).

Classe – Sporozoasida (Leukart, 1879).

Subclasse – Coccidiasina (Leukart, 1879).

Ordem – Eucoccidiorida (Léger & Doboscq, 1910).

Subordem – Eimeriorina (Léger, 1911).

Família – Sarcocystidae (Poche, 1913).

Subfamília – Toxoplasmatinae (Biocca, 1956).

Gênero – *Neospora* (Dubey, Carpenter, Speer, Topper e Uggla, 1988).

Espécie – *N. caninum* (Dubey, Carpenter, Speer, Topper e Uggla, 1988).

Marsh et al. (1998) propuseram *N. hughesi* como uma espécie distinta para um isolado de *Neospora* proveniente de um equino, com base em diferenças moleculares. Os isolados bovino e canino foram considerados o mesmo organismo (Marsh et al., 1998; Dubey et al., 1999).

CICLO DE VIDA DE *N. caninum*

O ciclo de vida de *N. caninum* ainda não foi totalmente elucidado. Esse parasito é um apicomplexa que necessita de dois hospedeiros, assim como é o ciclo de vida de *T. gondii*. Vários hospedeiros intermediários (HI) têm sido bem descritos, principalmente o bovino. Entretanto, até 1998, um hospedeiro definitivo ainda não tinha sido identificado, quando McAllister et al.

(1998a) conseguiram observar oocistos não esporulados de *N. caninum* em fezes de cães infectados experimentalmente; no ano seguinte, Lindsay et al. (1999a) confirmaram os achados desses autores. Apesar de oocistos já estarem bem descritos (Lindsay et al., 1999b), a fase sexual completa do parasito na mucosa intestinal do hospedeiro definitivo ainda não foi determinada.

Os cães podem ser infectados naturalmente pela ingestão de cistos teciduais (polizóicos repletos de bradizoítos) presentes principalmente no sistema nervoso central (Dubey, 1999; Anderson et al., 2000; Dijkstra et al., 2001a), pela ingestão de placentas infectadas de bovinos (Dijkstra et al., 2001a) e músculos bovinos infectados, como recentemente descrito por Peters et al. (2001a), ou, ainda, podem ser infectados verticalmente durante a vida intra-uterina (Dubey & Lindsay, 1996).

Os bovinos são infectados principalmente de forma vertical, sendo esta forma responsável por até 95% das infecções no rebanho (Dijkstra et al., 2001b). Portanto, como esse tipo de transmissão não é efetivo em 100% da população, o parasito necessita de uma forma de infecção horizontal para se manter no rebanho (Dyer et al., 2000). Essa infecção horizontal nos bovinos pode ser adquirida, principalmente, pela ingestão de oocistos esporulados, em consequência da contaminação de pastagens, silagem, cochos ou bebedouros por fezes de cães criados conjuntamente com o rebanho (De Marez et al., 1999). Após a ingestão dos oocistos, os zoítos dividem-se por endodiogenia. Os taquizoítos dividem-se rapidamente em zoítos ovóides, lunares ou em forma de banana, que podem infectar e destruir diferentes tipos celulares. Os bradizoítos dividem-se lentamente e localizam-se no interior dos cistos, envoltos por uma grossa parede de até 4 µm (Speer et al., 1999). Os bovinos ainda podem ser auto-infectados pela recrudescência de cistos que tiveram a parede rompida, com posterior liberação de

bradizoítos no próprio animal (Wouda et al., 1999a).

Os oocistos são excretados não esporulados e, dependendo das condições de temperatura e aeração ambiental, podem esporular dentro de três a sete dias, quando o esporonte central se divide em dois esporocistos com quatro esporozoítos cada, caso em que são infectivos (Dubey & Lindsay, 1996). Ainda, não se sabe se os cães excretam oocistos por mais de um período na vida.

NEOSPOROSE EM CÃES

Em vários artigos, a importância de *N. caninum* para a espécie canina tem sido revisada (Dubey & Lindsay, 1996; Dubey, 1999).

A sintomatologia do cão com neosporose pode variar amplamente. Sinais neurológicos, que dependem do sítio parasitado, são geralmente observados e se expressam como hiperextensão rígida dos membros posteriores, dificuldade em deglutir, paralisia da mandíbula, flacidez muscular, atrofia muscular e paralisia de nervos faciais. Têm sido relatados também dermatites, cardiomiosite e pneumonia. Animais de qualquer idade podem ser

infectados, mas parece que filhotes são mais acometidos, principalmente pela forma neurológica (Barber & Trees, 1996; Dubey et al., 1998). A infecção é mais freqüente em cães de áreas rurais (Sawada et al., 1998; Wouda et al., 1999b).

A freqüência de infecção em cães é variável. No Quadro 2, apresenta-se a freqüência de infecção por *N. caninum* em algumas regiões estudadas.

NEOSPOROSE EM BOVINOS

A infecção de bovinos por *N. caninum* tem sido relatada em vários países. No Quadro 3, apresenta-se a freqüência de infecção por esse parasito em bovinos nas várias regiões estudadas.

O abortamento é o único sintoma apresentado pelas vacas, cuja infecção esteja sendo expressa, o qual pode ser observado em qualquer época da gestação, mas, principalmente, entre o quarto e o sétimo mês. Os fetos podem morrer no útero, ser reabsorvidos, mumificados, autolisatos, natimortos e nascer a termo e sem alterações clínicas, mas cronicamente infectados (Dubey & Lindsay, 1996).

Quadro 2 - Freqüência de infecção por *Neospora caninum* em cães em algumas regiões estudadas

Local	Freqüência	Referência
Tanzânia, África	22%	Barber et al. (1997)
Austrália	6 - 12%	Barber et al. (1997)
Uruguai	20%	Barber et al. (1997)
Japão - áreas urbanas	7%	Sawada et al. (1998)
Japão - áreas rurais	31%	Sawada et al. (1998)
Holanda - áreas urbanas	5,5%	Wouda et al. (1999b)
Holanda - áreas rurais	23,6%	Wouda et al. (1999b)
Bahia, Brasil	18,18%	Santos et al. (1999)
Minas Gerais, Brasil	6,7%	Mineo et al. (2001)

Quadro 3 - Frequência de infecção por *N. caninum* em bovinos em algumas regiões estudadas e referências

Local	Aptidão	Frequência	Referência
Canadá	Leite	16,6%	Paré et al. (1998)
Canadá	Corte	30%	Waldner et al. (1998)
Nova Zelândia	Leite	6,75-8,5%	Reichel (1998)
Bahia - Brasil	Leite	14,9%	Gondim et al. (1999)
Tailândia	Leite	6%	Suteeraparp et al. (1999)
Espanha	Leite	30,6%	Mainar-Jaime et al. (1999)
Holanda	Leite	13,9-51,5%	Wouda et al. (1999a)
Inglaterra	Leite	17,1%	Davison et al. (1999)
Nordeste - EUA	Corte	24%	Sanderson et al. (2000)
Taiwan	Leite	44,9%	Ooi et al. (2000)

Os bezerros infectados podem ter sinais neurológicos e baixo peso e ser incapazes de levantar ou nascer sem sinais clínicos anormais. Os membros anteriores ou posteriores podem estar flexionados ou hiperestendidos (ANEXO II - PRANCHA I). O exame neurológico pode revelar ataxia, diminuição dos reflexos patelares e perda da propriocepção. Os bezerros podem apresentar, ainda, exoftalmia ou assimetria dos olhos (Dubey & Lindsay, 1996).

As vacas podem abortar esporadicamente ou em grupo dentro de poucas semanas, e os abortamentos podem persistir no rebanho. *Neospora caninum* pode causar repetição do abortamento na mesma vaca (Dubey & Lindsay, 1996; Anderson et al., 2000).

O parasito se mantém no rebanho principalmente por transmissão vertical, que é responsável por até 95% das infecções (Dijkstra et al., 2001a).

IMPACTO ECONÔMICO DA NEOSPOROSE NA BOVINOCULTURA

O principal efeito das infecções por *N. caninum* em bovinos é o abortamento. O cálculo do impacto econômico dessa infecção irá depender dos custos indiretos, bem como do valor das perdas fetais. Esses custos indiretos incluem o serviço

veterinário e os custos associados com o estabelecimento do diagnóstico, novos cruzamentos do animal que abortou, diminuição no período de lactação, perdas na produtividade do leite e seus derivados, custos com reposição e descarte de vacas que abortaram (Anderson et al., 1991; Thurmond & Hietala, 1996). Não existem, ainda, dados concretos das perdas econômicas devido à neosporose na indústria da bovinocultura em nenhum lugar do mundo (Dubey, 1999). Entretanto, em alguns estudos têm sido feitas projeções e simulações para se determinar o custo da neosporose na pecuária.

O primeiro estudo de que se tem conhecimento foi o de Anderson et al. (1991), na Califórnia, onde de 20 a 43% de todos os abortamentos bovinos são atribuídos ao parasito, e, com isso, as perdas econômicas diretamente ligadas aos abortamentos por *Neospora* foram calculadas em aproximadamente US\$35 milhões por ano. Segundo J.P. Reynolds (1999), *apud* Dubey (1999), um abortamento na metade da gestação, período mais provável do abortamento causado por *Neospora*, custa ao produtor de US\$600 a US\$1,000 cada, na Califórnia.

Na Holanda, de 15 a 20% dos abortamentos bovinos são devidos à neosporose (Wouda et

al., 1997). Na Austrália, tem sido estimado que os custos da neosporose na indústria do leite representam US\$85 milhões e, na indústria de corte, US\$25 milhões anualmente (Ellis, 1997, *apud* Dubey, 1999).

Um modelo de simulação dos efeitos econômicos dos abortamentos causados por *N. caninum* em bovinos leiteiros na Nova Zelândia estimou perdas anuais na indústria leiteira ao redor de NZ\$16 milhões, ao passo que em fazendas individuais com rebanhos infectados essas perdas foram calculadas em cerca de NZ\$2.000 a NZ\$4.000. Neste estudo, foram levados em consideração, além dos abortamentos, as perdas com a diminuição da produção de leite, a perda de bezerras e os custos de reposição (Pfeiffer et al., 1997).

O efeito da infecção pelo protozoário na produção de leite em vacas de primeira lactação foi determinado por Thurmond & Hietala (1997), na Califórnia. As vacas soropositivas na primeira lactação produziram menos leite (cerca de 1,2 kg/vaca/dia) que as soronegativas durante todo o período de lactação. Essa diminuição em um típico período de produção de leite de 305 dias corresponde a menos de 346 kg de leite/ano, aproximadamente, produzidos pelas vacas soropositivas.

A infecção por *N. caninum* foi associada ao descarte de vacas leiteiras em um estudo realizado por Thurmond & Hietala (1996), que verificaram que uma vaca soropositiva foi descartada 6,3 meses mais cedo que vacas soronegativas e tinham 1,6 vez maior risco de serem descartadas quando comparadas com vacas soronegativas, devido ao abortamento. Para vacas descartadas por baixa produção de leite, o risco de descarte de uma vaca soropositiva foi duas vezes maior que o de uma vaca soronegativa.

Segundo Waldner et al. (1998), no Canadá, o risco de uma vaca de corte ser descartada

por qualquer razão, incluindo falhas reprodutivas, foi significativamente maior em vacas soropositivas que em soronegativas. Aquelas tiveram maior probabilidade de abortar do que estas. O pobre desempenho produtivo de animais soropositivos para *N. caninum* foi a terceira razão mais comum de descarte.

Kasari et al. (1999) estimaram as perdas produtivas e econômicas da infecção pelo protozoário em rebanhos de corte, no Texas. O peso estimado do bezerro à desmama foi 5,6 kg menor em rebanhos infectados. As perdas médias com a infecção estiveram entre US\$23,29 e US\$35,21 por cabeça em grandes rebanhos. As perdas econômicas totais para a indústria da carne bovina no Texas, devido a essa doença, variaram de US\$7,6 milhões a US\$24 milhões, dependendo do modelo usado para simulação dos custos.

Neospora caninum NO BRASIL

Os relatos de infecção por *N. caninum* no Brasil começaram em 1996, em bovinos de corte e leite, com histórico de abortamentos (Brautigam et al., 1996; Gondim & Sartor, 1997; Pituco et al., 1998).

A partir de 1999, vários estudos foram publicados relatando infecções do parasito em cães, bovinos e bubalinos em vários estados brasileiros (Sartor et al., 1999; Ogawa et al., 1999; Andreotti et al., 1999; Gondim et al., 1999b; Stöbbe & Cortes; 1999, Melo & Leite, 1999). O primeiro estudo de soroprevalência foi realizado na Bahia (Gondim et al., 1999c), cujo resultado foi de 14,09% (63/447) em 14 rebanhos leiteiros. Ainda nesse ano, foi relatado o primeiro diagnóstico de cistos teciduais em um feto abortado, proveniente de um rebanho de São Paulo, sendo o primeiro caso de confirmação diagnóstica publicado no Brasil (Gondim et al., 1999d).

Em 2000, foram relatados casos de abortamentos devidos ao protozoário, em bovinos do Rio Grande do Sul (Corbellini et al., 2000).

Os primeiros isolamentos de taquizoítos de *N. caninum* no Brasil foram descritos na Bahia (Gondim et al., 2001) e nos Estados de São Paulo e Minas Gerais (Okuda et al., 2001) e, ainda, a primeira notificação da infecção pelo parasito em bovinos de Santa Catarina (Corbellini et al., 2001). O primeiro relato de soroprevalência da infecção pelo parasito em bovinos em Minas Gerais foi publicado em 2001 (Melo et al., 2001).

A soroprevalência de infecção por *N. caninum* em fêmeas bubalinas na região do Vale do Ribeira, em São Paulo, foi descrita por Fujii et al. (2001); em estudo realizado em Uberlândia, Minas Gerais, foram encontrados 6,7% de cães soropositivos para esse parasito (Mineo et al., 2001).

PROFILAXIA E CONTROLE DA NEOSPOROSE

As recomendações para a profilaxia e controle da infecção por *N. caninum* têm variado de acordo com cada rebanho particular, mas, de forma geral, a maioria dos trabalhos tem recomendado a observação de pontos cruciais da epidemiologia do parasito, como priorizar a aquisição de vacas soronegativas para o parasito (Anderson et al., 2000) e proteger os alimentos dos bovinos (silagens, feno e pastagens) da contaminação por oocistos excretados junto com as fezes de cães (McAllister & Wallace, 1999).

Prevenir que cães defequem nos alimentos estocados para o gado também tem sido recomendado. Isso pode ser viável se instalações fechadas forem usadas para estocar os alimentos, cobrir os silos com plásticos e elevar as cercas ao redor das pilhas de alimentos. Tem sido proposto, também, encorajar a população a controlar

os cães dentro e ao redor das fazendas com medidas como esterilizar todos aqueles animais que não sejam desejados para a reprodução e solicitar aos vizinhos que prendam seus cães ou os esterilizem. Ainda, se for o caso, deve-se contactar as autoridades locais à respeito de programas de castração dos cães (McAllister & Wallace, 1999).

Os fetos abortados e os restos de partos devem ser descartados em locais adequados, para prevenir o seu consumo por cães. Deve-se também ser considerada a seleção de novilhas para reposição que não possuam evidência de infecção por *Neospora*.

O descarte de animais soropositivos, em muitos casos, tem se mostrado não ser praticável, devido ao alto custo (Dubey & Lindsay, 1996).

Embora vários agentes microbianos tenham sido testados contra *N. caninum in vitro*, atualmente não se conhecem métodos pelos quais uma vaca infectada possa ser tratada da infecção (Anderson et al., 2000). No mercado americano existe uma vacina (Bayer) sendo comercializada, mas não foram encontradas referências à respeito da segurança desse produto (Jennifer Bremmer, 2000¹; McAllister et al., 2000). Ainda, não existem vacinas disponíveis no mercado brasileiro.

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Minas Gerais é um estado potencialmente pecuário, sendo o maior produtor de leite do Brasil, com a projeção para 2001 de um efetivo na pecuária leiteira de 8.807.731 cabeças, sendo 3.081.025 vacas leiteiras e uma produção anual de 8,5 bilhões de litros de leite (Anuário da Pecuária Brasileira,

¹ Jennifer Bremmer, 13/06/2000.

<http://www.iowafarmer.com/99news/990820dogkill.htm>

2001), o que corresponde à cerca de 30,3% da produção leiteira anual do Brasil. Com esses dados, aliados às referências aos prejuízos econômicos relatados em decorrência da infecção em outras partes do mundo, foi constatado que se tornava urgente a realização de estudos à respeito de infecção causada pelo parasito nos rebanhos leiteiros do estado.

Em 1999 foram testados três rebanhos com problemas de abortamentos, quando se detectaram, pelo teste ELISA, três vacas soropositivas ao parasito (ANEXO I). Com isso, foi verificada a necessidade de realizar uma amostragem mais ampla, com o objetivo de conhecer a prevalência sorológica de infecção por *N. caninum* em rebanhos bovinos leiteiros (CAPÍTULO II) e a frequência da infecção em diferentes sistemas de produção de leite (CAPÍTULO III), bem como avaliar a associação de *N. caninum* com outros agentes abortivos para os bovinos e também responsáveis por sérios prejuízos econômicos à pecuária mineira, em amostras de soro de bovinos leiteiros em rebanhos em Minas Gerais (CAPÍTULO IV).

Com o objetivo de rastrear outros hospedeiros definitivos que poderiam ter importância para o ciclo local do parasito, foram testadas, por imunofluorescência indireta, amostras de soro de lobos-guarás e de cachorros-do-mato (CAPÍTULO V).

Outros objetivos, como o desenvolvimento futuro de testes diagnósticos para a infecção pelo parasito, foram iniciados quando da aquisição, por doação do Dr M. M. McAllister (University of Illinois, Urbana, USA), das cepas de *N. caninum* "Beef" e "Illinois", que foram mantidas em cultivo celular. Essas cepas ainda foram usadas para o treinamento do cultivo *in vitro* do parasito e para infectar "Mongolian Gerbils" (*Meriones unguiculatus*), com os objetivos de mantê-las *in vivo* e conhecer a sintomatologia apresentada na neosporose.

Por fim, também foi objetivo deste trabalho o isolamento de oocistos de cães infectados com amostras de tecido nervoso de vacas naturalmente soropositivas para o parasito, quando foram infectados quatro cães, sendo observados por 30 dias e acompanhados diariamente pela técnica de flutuação com açúcar (ANEXOS I e II).

***Neospora caninum* - DISTRIBUIÇÃO DE ANTICORPOS EM TRÊS FAIXAS ETÁRIAS DE REBANHOS BOVINOS LEITEIROS EM MINAS GERAIS**

INTRODUÇÃO

Neospora caninum (Protozoa: Apicomplexa) é um parasito recentemente descrito (Dubey et al., 1988a) que tem o cão como hospedeiro definitivo (McAllister et al., 1998a) e o bovino como um dos seus hospedeiros intermediários (Thilsted & Dubey, 1989). Esse parasito causa prejuízos consideráveis à pecuária, na forma de abortamentos, queda na produção de leite, nascimento de animais com baixo peso e com problemas teratogênicos, fetos mumificados e persistentemente infectados (Anderson et al., 2000). A neosporose tem distribuição mundial e é altamente prevalente na América do Norte (Anderson et al., 2000).

Em Minas Gerais, anticorpos para *N. caninum* foram relatados inicialmente em 1999, quando foram detectadas três vacas soropositivas em dois rebanhos leiteiros com problemas de abortamento (Melo & Leite, 1999). Minas Gerais possui o maior rebanho leiteiro do Brasil e cerca de 21 milhões de cabeças de bovinos, isso aliado a um número grande de abortamentos, em que a etiologia não é conhecida. Em razão disso, este trabalho objetivou conhecer a situação sorológica, bem como analisar a distribuição de anticorpos em animais de diferentes faixas etárias de alguns rebanhos leiteiros em Minas Gerais: verificar a presença de cães junto com os rebanhos; e embasar futuras pesquisas que justifiquem a avaliação dos prejuízos causados pelo protozoário nos rebanhos bovinos leiteiros em Minas Gerais.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi analisada uma bateria de soro sanguíneo composta por 584 amostras de bezerras, novilhas e vacas pertencentes a 18 rebanhos leiteiros, localizados em 14 municípios de Minas Gerais: Barbacena, Betim, Caeté, Carmo do Paranaíba, Cordisburgo, Igarapé, Itabirito, Lavras, Onça do Pitangui, Ouro Preto, Patos de Minas, Pedro Leopoldo, Perdões e Pompeu (ANEXO IV). Os soros foram coletados aleatoriamente entre novembro de 1996 e junho de 1997, e cerca de 15% dos animais (de acordo com Gondim et al., 1999) de cada faixa etária dos rebanhos foram testados. As amostras foram alocadas em três faixas etárias (faixa 1 - 7 aos 18 meses de idade, faixa 2 - 19 a 30 meses e faixa 3 - vacas \geq 31 meses).

O teste utilizado foi um ELISA indireto comercial², sendo a leitura realizada num aparelho automatizado³ com filtro de 620 nm.

A prevalência de anticorpos nas amostras em cada faixa etária foi calculada de acordo com o método descrito por Sampaio (1998). Para compará-las, foi feito o teste de Dispersão de Frequências (Qui-Quadrado - χ^2), no programa estatístico EPI INFO - versão 6.04b (Dean et al., 1994).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No total de amostras analisadas (584) foram encontradas 109 (18,66%) positivas. Quando as faixas etárias foram separadas,

² Herdcheck®, IDEXX Laboratories, Inc. USA.

³ Labsystems Multiskan MS (Finland).

observaram-se na primeira, das 117 amostras testadas, 21 positivas (prevalência de 17,94% - Intervalo de Confiança de 17,04 a 18,84%), enquanto na segunda, com 126 animais, e na terceira, com 341 animais, foram encontradas, respectivamente, 26 (20,63%, IC de 19,6 a 21,66%) e 62 (18,18%, IC de 17,27 a 19,09%) amostras positivas, no período de novembro de 1996 a junho de 1997. Não houve diferença ($P > 0,05$) entre as três faixas etárias estudadas.

Em praticamente todas as propriedades, exceto em uma no Município de Lavras, foram encontrados animais positivos, e a ocorrência de positividade de anticorpos entre os rebanhos estudados variou de 3,7 a 72,72%.

Os dados encontrados indicaram uma ampla difusão do *N. caninum* nos rebanhos estudados, bem como nos municípios amostrados. Apesar de ter sido encontrado um rebanho em que todos os animais testados foram soronegativos no Município de Lavras, em outra propriedade e nesse mesmo município, observou-se uma ocorrência de 21,42% de animais soropositivos. O pequeno número de animais amostrados (14) nesse rebanho soronegativo pode ter influenciado o resultado, já que o número de animais amostrados nos 18 rebanhos variou de 14 a 64, embora a mesma proporção tenha sido observada para realização dos testes sorológicos (15%). Os resultados encontrados foram discretamente superiores aos obtidos por Gondim et al. (1999), que encontraram 14,09% de soropositividade em 447 vacas leiteiras de 14 rebanhos bovinos na Bahia. Entretanto, outros trabalhos evidenciaram que a soroprevalência para o parasito em rebanhos leiteiros é bastante variável, inclusive em estudos em que a separação etária foi realizada e houve diferenciação, como no trabalho de Dyer et al. (2000), que encontraram 17,9% em neonatos, 26,2% em bezerras, 39,07% em

novilhas e 26,9% em vacas em lactação em um rebanho com problemas de abortamentos por *Neospora* nos Estados Unidos.

A distribuição de anticorpos para *N. caninum* foi similar nas três faixas etárias estudadas, não diferindo significativamente, o que indica, possivelmente, uma mesma exposição ao parasito nas três faixas etárias, já que a prevalência se manteve teoricamente constante, com um discreto decréscimo na última faixa, o que pode ser explicado, provavelmente, pelo descarte de animais soropositivos que abortaram, sendo essa última faixa representada pelos animais em franca produção. Segundo Mainar-Jaime et al. (1999), a ausência de aumento na prevalência com a idade pode ser explicada se uma exposição a uma fonte pontual a todos os animais do rebanho resultar em taxas de infecção similares em todas as faixas etárias.

A presença de cães foi observada nas fazendas durante a visita, à época da coleta do sangue. Algumas propriedades os criavam conjuntamente com os rebanhos, com o objetivo de guarda das propriedades ou como mascotes, que tinham livre acesso a todos os ambientes das fazendas. Em outras, animais errantes surgiam com alguma frequência e eram tolerados, enquanto em outras eram totalmente abominados. Entretanto, esses dados não foram analisados estatisticamente.

Esperava-se que naquelas propriedades com maior presença de cães houvesse maior ocorrência de animais soropositivos, o que não aconteceu. Numa das propriedades onde eram mantidos constantemente sete cães como vigias, a ocorrência de animais amostrados soropositivos foi de 10,87%, enquanto em outra onde, em hipótese alguma, a presença de cães era tolerada, foi encontrado uma ocorrência de 72,72% dos animais amostrados soropositivos. No único rebanho em que não foram encontrados animais sororreagentes, não foram

observados cães; entretanto, essas observações foram pontuais. Paré et al. (1998), analisando a importância da presença de cães junto com os rebanhos que tinham problemas de abortamento, concluíram que naqueles rebanhos em que havia três ou mais cães a taxa de infecção foi maior que naqueles que possuíam um ou dois cães e que, por sua vez, foi maior, significativamente, do que naqueles rebanhos onde não havia cães. Outra análise revelou que, nos rebanhos estudados em que houve a presença de um cão nos últimos três anos, a soroprevalência em bovinos leiteiros para o parasito foi $\geq 20\%$. Também, Mainar-Jaime et al. (1999) encontraram alta prevalência de vacas soropositivas, em que houve associação com o número de cães nas fazendas. Apesar de, à época deste trabalho, a função dos cães na transmissão do parasito ainda ser incerta, esses resultados já justificavam a restrição do acesso de cães às vacas, aos alimentos e às áreas de maternidade (Paré et al., 1998). Entretanto, é importante observar que, além de a prevalência de cães soropositivos ter sido muito baixa em alguns trabalhos (cerca de 7% - Cheadle et al., 1999), a eliminação dos oocistos (uma das formas infectantes) nas fezes dos cães é realizada num período muito curto, cerca de sete dias, e ainda não se sabe se essa eliminação pode ser realizada mais de uma vez na vida de cada cão (McAllister, M.M. – Comunicação pessoal, 2000⁴).

O impacto econômico da presença do parasito nos rebanhos dos Estados Unidos é alto. Na Califórnia são estimadas perdas anuais na pecuária leiteira que equivalem a US\$35 milhões em decorrência, principalmente, dos abortamentos (Anderson et al., 1991). As perdas econômicas na lactação também foram expressas em vacas soropositivas na Califórnia, que deixaram de produzir 762 lb/vaca de leite num típico

período de lactação de 305 dias (Thurmond & Hietala, 1997). Em outro trabalho na Nova Zelândia, Pfeiffer et al. (1997) estimaram que as perdas econômicas anuais na indústria leiteira podem alcançar NZ\$16 milhões, e as perdas econômicas individuais por rebanho podem variar de NZ\$2,000 a NZ\$4,000. Esses custos incluem os abortamentos, a proporção de vacas descartadas e a reposição no rebanho e a queda na produção leiteira, bem como na produção de gordura no leite.

Isso evidencia que o parasito é mundialmente importante para a pecuária leiteira. Os resultados encontrados neste trabalho indicaram a presença de animais soropositivos em vários rebanhos com problemas de abortamentos, em Minas Gerais, mas o diagnóstico sorológico é apenas presuntivo. Apesar de os abortamentos não terem sido confirmados como consequência da infecção pelo parasito, é justo recomendar que o impacto econômico da infecção seja avaliado em toda a rede de produção de leite de Minas Gerais.

⁴ Dr. Milton M. McAllister (University of Illinois). E-mail: mcallister@cvm.uiuc.edu

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

INTRODUÇÃO

Neospora caninum (Apicomplexa: Toxoplasmatinae) é um parasito coccidio que é 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); na Nova Zelândia, as perdas econômicas anuais na indústria leiteira podem alcançar NZ\$16 milhões. Esses custos incluem os abortamentos, a proporção de vacas descartadas e a reposição do rebanho e 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 três formas de infecção principais nos bovinos: a forma vertical, mais freqüente, a auto-infecção de animais imunossuprimidos (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 a ração bovina (Dijkstra et al., 2001a). O cão é a única espécie atualmente relacionada como hospedeira definitiva de *N. caninum* (McAllister et al., 1998a).

Em Minas Gerais, anticorpos para *N. caninum* foram relatados, inicialmente, por Melo & Leite (1999). 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 infecção pelo parasita, bem como aqueles que maximizem a expressão patogênica desse agente nesses rebanhos.

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

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados 18 rebanhos leiteiros, localizados em 14 municípios mineiros (ANEXO IV), totalizando 584 amostras de soro de bezerras, novilhas e vacas. O número de indivíduos amostrados variou de 14 a 64, nos rebanhos amostrados (Tab. 1).

Esses rebanhos foram classificados em dois grupos: 1) 238 animais provenientes de oito rebanhos produtores de leite tipo 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 alto grau de renovação dos animais de produção (compra e venda), bem como a maioria deles era mantida

Tabela 1 - Total de amostras analisadas, porcentagem de positivas para *Neospora caninum* e municípios de localização dos rebanhos estudados

Rebanhos Leiteiros	Total de Amostras	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

confinada em "freestall"; 2) 346 animais provenientes de 10 rebanhos produtores de leite tipo C, que foram agrupados pelo fato de o 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 à do primeiro grupo (tipos comerciais ou mestiços) e, em geral, ausência de estabulação.

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 tratar de rebanhos de corte. A maioria desses rebanhos era conhecida por já ter tido amostras de soro de alguns animais submetidas previamente 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.

Apenas fêmeas foram amostradas, e o estado de gestação e a ocorrência de abortamentos não foram levados em consideração para selecionar os animais ou os rebanhos. As amostras foram coletadas de acordo com a amostragem aleatória estratificada entre novembro de 1996 e junho de 1997. Os animais dos dois grupos foram estratificados de acordo com três faixas etárias: faixa I – animais de 7 a 18 meses de idade, faixa II – animais de 19 a 30 meses e faixa III – animais com idade a partir de 31 meses (Tab. 2).

Tabela 2 - População total estudada por tipo de leite produzido e faixa etária, amostras necessárias e amostras coletadas na amostragem aleatória estratificada

Grupo de Produção e Faixa Etária	População Total	Amostras Necessárias	Amostras Coletadas
Leite C			
Faixa etária I	298	49	65
Faixa etária II	335	50	73
Faixa etária III	1.087	56	208
Total	1.720	155	346
Leite A/B			
Faixa etária II	209	46	52
Faixa etária III	234	47	53
Faixa etária IV	675	54	133
Total	1.118	147	238
Total geral	2.838	302	584

Para cálculo do número de amostras necessárias, foi utilizado o programa EPI-INFO, versão 6.0 (Statcalc calculator - Sample size & power - Population survey), elaborado por Dean et al. (1994). O cálculo foi baseado na fórmula apresentada por Kish & Leslie (1965) para estudo populacional, no qual a amostragem foi feita de forma aleatória para cada estrato da população.

No estudo proposto, foi estimada uma frequência esperada de animais positivos ao exame de 11% (Gondim et al., 1999) para cada estrato da população, erro aceitável de 3% e nível de confiança de 95%. De acordo com as estimativas apresentadas, seria necessário uma amostragem de 302 animais, distribuídos em todos os estratos, em uma população total de 2.838 animais. A população total em cada faixa etária estudada, a quantidade de amostras necessárias para as comparações e a quantidade de amostras coletadas são apresentadas na Tab.2.

O sangue foi coletado uma única vez de 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 rebanho, todas as amostras foram coletadas em um único dia e, após a coleta, foram imediatamente transportadas ao laboratório no DMVP – EV – UFMG (Belo Horizonte, Minas Gerais), para separação do soro. O soro foi alíquotado e estocado a -20°C até o uso.

Foi utilizado um “kit” ELISA indireto comercial (Herdcheck[®], IDEXX Laboratories, Inc., EUA), sendo os testes realizados de acordo com as recomendações do fabricante. A leitura das placas foi executada em uma leitora automática (Multiscan MS - Labsystems, Finland) em filtro de 620 nm. Esse teste é derivado de um ELISA originalmente descrito por Paré et al. (1995), cujo 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 $\geq 0,50$ 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 as respectivas faixas

etárias, foi realizada a análise estatística pelo teste de dispersão de frequências (χ^2) (com correção de Yates), em tabelas de contingência. A diferença foi considerada significativa quando $P < 0,05$ (Sampaio, 1998).

Questionários foram aplicados aos responsáveis pelos rebanhos, visando obter informações relacionadas a técnicas de manejo aplicadas aos rebanhos, uso de tecnologias e trânsito de animais (compra, venda, exposições etc.), tipo de criação e manejo sanitário, entre outros, avaliando-se, assim, possíveis fatores de estresse aos quais os animais foram submetidos. O principal objetivo dos questionários foi auxiliar na análise dos dados obtidos, de forma que pudessem ser encontradas possíveis explicações para os resultados encontrados por meio da sorologia (ANEXO III).

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 produtores de leite A/B, a ocorrência de soropositividade variou de zero a 72,73%. Em todos os 10 rebanhos produtores de leite tipo C foram encontrados animais soropositivos, e a ocorrência de

soropositividade nesses rebanhos variou de 3,70 a 25%. O total de amostras analisadas, a porcentagem de amostras soropositivas e o município em que estava localizado cada rebanho individual, nos dois grupos de produção de leite estudados, são apresentados na Tab.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 Tab.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 a *N. caninum* era totalmente desconhecida, e os dados obtidos com os questionários são apresentados nas Tabs. 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, 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	n	Leite C		Leite A/B		
		Positivas	% Positivas	n	Positivas	% Positivas
I	65	5	7,69% ^{b, Δ}	52	16	30,77% ^{a, Δ}
II	73	9	12,33% ^{d, Δ}	53	17	32,08% ^{c, Δ}
III	208	30	14,42% ^{f, Δ}	133	32	24,06% ^{e, Δ}
Total	346	44	12,72% ^b	238	65	27,31% ^a

Na mesma linha, letras minúsculas diferem entre si ($P < 0,05$).

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

Tabela 4 - Dados produtivos e reprodutivos médios dos rebanhos leiteiros dos tipos C e A/B

Dado pesquisado	Tipo C	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 prenhez	1,7	1,7
Taxa média de fertilidade (%)	77,8	80,8
Porcentagem de rebanhos em que foi usada a inseminação artificial (IA)	90%	100%
Porcentagem de rebanhos estudados que já utilizaram TE	0%	25%
Porcentagem de rebanhos vacinados contra HVB1, DBV, VRSB e PI 3	10%	25%
Porcentagem de rebanhos em que foram relatados problemas reprodutivos	100%	100%

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

Dado Pesquisado	Tipo C	Tipo A/B
Número de ordenhas/dia:		
Duas	100%	50%
Três	0%	50%
Ordenha mecanizada	90%	100%
Criação de bezerras:		
Individual (casinhas)	50%	75%
Coletivamente	50%	25%
Criação das vacas em produção		
"Freestall"	30%	62,5%
Pasto	70%	37,5%
Trânsito de animais		
Rebanhos 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 indicam que o protozoário está amplamente disseminado nos rebanhos bovinos produtores de leite tipos C e A/B estudados, nos 14 municípios amostrados de Minas Gerais. Entretanto, os dados de sorologia apenas refletem o estado de infecção dos animais estudados.

Não houve associação significativa ($P > 0,05$) entre a distribuição de animais soropositivos nas três faixas etárias estudadas nos rebanhos produtores de leites A/B e C. Isso 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 (Schaes et al., 1998; Wouda 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, 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 ($P < 0,05$), sendo maior a porcentagem de animais soropositivos nos rebanhos leiteiros do tipo A/B (Tab. 3), e isso pode ser reflexo de maior pressão produtiva nesse tipo de produção de leite.

Para que uma provável comparação entre as faixas etárias pudesse ser realizada, foi proposto uma estimativa de frequência esperada de animais soropositivos ao exame de 11% para cada estrato da população. Esse valor determinado para a frequência esperada foi inferior ao observado na Bahia por Gondim et al. (1999), que encontraram 14,09% em 447 vacas leiteiras provenientes de 14 rebanhos leiteiros.

Na faixa etária I, quando comparados os dois grupos de produção de leite, verificou-se uma associação significativa ($P < 0,05$), sendo a frequência de soropositividade maior nos rebanhos produtores de leite A/B (Tab. 3).

Geralmente, cerca de 12,5% de um rebanho consiste de animais de até seis meses de idade, cujas mães usualmente ainda estão presentes no rebanho (Dijkstra et al., 2001b). Apesar de a importância da análise de animais com idade de até seis meses ser conhecida, principalmente no pareamento vaca-bezerro, nos estudos epidemiológicos o teste ELISA utilizado não foi 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 constituiu entrave para que se pudessem amostrar os bezerros antes de ingerirem o "pool" de colostro. Por isso, optou-se por não incluir animais mais jovens do que sete meses.

De acordo com os questionários, entretanto, 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%, coletivamente. Já nos rebanhos leiteiros do tipo A/B, em 75% as bezerras eram criadas em casinhas individuais e, em 25% desses rebanhos, coletivamente, com acesso ao pasto (Tab. 5). Não foi evidenciado se o sistema de criação das bezerras pode significativamente influenciar a aquisição de infecção pós-natal, apesar de teoricamente as bezerras com acesso ao pasto terem maior oportunidade de se infectarem horizontalmente, em comparação 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 (Tab. 3), e nesse caso infecções horizontais, por certo, não são significativamente importantes. A maior frequência de bezerras soropositivas refletiu a maior frequência de novilhas e vacas infectadas (Tab. 3). 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 ($P < 0,05$), mas em ambos os casos o modelo de criação foi o mesmo. Nos rebanhos leiteiros do tipo A/B, a frequência de soropositividade nessa faixa etária foi quase

três vezes superior à mesma faixa etária dos rebanhos leiteiros do tipo C (Tab. 3). A maior pressão produtiva (maior estresse) nos rebanhos leiteiros do tipo A/B pode ter influenciado esses índices. 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) (Tab. 4). Como a transmissão congênita de *N. caninum* implicou ambos os sistemas, sabe-se que isso ocorre em menos de 100% dos casos e essa infecção, eventualmente, poderá desaparecer de rebanhos sem alguma forma de infecção pós-natal, ao menos que animais soropositivos sejam continuamente selecionados para cruzamentos (Dijkstra et al., 2001b). Ainda nessa faixa etária, segundo Hietala & Thurmond (1999), entre 29 e 35 meses de idade o pico de anticorpos relatado indica uma possível associação com fatores fisiológicos ou de manejo únicos do primeiro período de lactação. A conexão entre as alterações fisiológicas ou o estresse nessa faixa etária com a lactação ou a parição tem sido pouco explorada.

Apesar de a 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 (Tab. 3). 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. Isso pode ser explicado pelo maior descarte de animais nessa faixa etária. Segundo Waldner et al. (1998), a maior prevalência de anticorpos em vacas mais jovens é devida ao descarte preferencial de vacas soropositivas mais velhas, que tiveram problemas reprodutivos adversos previamente, levando a menos vacas positivas nessa faixa etária. Isso foi ratificado pelos dados do presente trabalho; 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: 10,2 anos (Tab. 4).

Nos rebanhos leiteiros do tipo C, ao contrário dos rebanhos do sistema A/B, a maior frequência foi observada na faixa etária III, e isso pode ser explicado pelo aumento da longevidade da população mais velha, em lactação.

Quando se comparou a faixa etária III entre os dois sistemas de produção de leite, a frequência de soropositividade no sistema de leite A/B diferiu ($P < 0,05$) daquela encontrada no sistema de leite C, sendo 2,15 vezes superior no primeiro sistema.

O estresse foi conceituado como a inabilidade de um animal interagir com o meio ambiente, um fenômeno que frequentemente se manifesta como falha em expressar o seu potencial genético, sendo refletido como menores taxas de crescimento, produção de leite, resistência a doenças ou fertilidade diminuída. Dados de campo, em vacas leiteiras, evidenciaram 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 produção de leite C, e isso pode implicar maiores chances de recrudescimento de auto-infecções pelo rompimento de cistos do parasito nos animais positivos. Foi especulado que surtos de abortamentos que ocorreram em alguns rebanhos, na Holanda, foram devidos, provavelmente, à recrudescência da infecção por *N. caninum*, seguida de um evento que causou imunossupressão em alguns animais (Dijkstra et al., 2001b; Wouda et al., 1999a).

Nos rebanhos leiteiros do tipo A/B foram observados maior número de ordenhas ao dia e maior porcentagem de vacas em produção estabuladas. Uma menor porcentagem de rebanhos produtores de leite tipo C mantinha as vacas em produção em

“freestall”, e nos demais rebanhos leiteiros do tipo C, após a ordenha, as vacas em produção voltavam para o pasto, onde eram mantidas (Tab. 5). Sanderson et al. (2000), trabalhando com rebanhos de corte, encontraram associação significativa ($P < 0,05$) entre a 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, aumentos da idade média de vacas no rebanho e da densidade de vacas durante o inverno e a compra de vacas foram associados à elevação da soroprevalência do parasito nos rebanhos ($P < 0,25$). No entanto, o manejo de vacas em pastos foi associado à baixa prevalência de soropositividade nos rebanhos.

Apesar de o sistema de produção do leite tipo A/B possuir um patamar de tecnificação da produção discretamente superior, a exemplo da maior porcentagem de rebanhos em que se utiliza a inseminação artificial, de relatos de já se ter usado transferência de embriões e empregado ordenhadeira mecânica em 100% dos rebanhos (Tab. 4), o grau de influência dessas variáveis na sorologia é incerto. Indiretamente, nesses rebanhos existe maior poder aquisitivo, o que, provavelmente, reflete em maiores chances de aquisição de animais soropositivos para reposição dos rebanhos.

As freqüências 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 de esta última ter sido discretamente maior em número no sistema de leite A/B, bem como o fato de o intervalo de partos ter sido discretamente menor, numericamente, no sistema de produção do tipo A/B (Tab. 4). Stenlund et al. (1999) relataram que os números médios de inseminações em vacas naturalmente infectadas por *N. caninum* foram de 1.7 e 2.2

na primeira e segunda gestações, respectivamente. No entanto, a maior preocupação com a qualidade sanitária dos animais no sistema de leite A/B, por exemplo maior número de rebanhos vacinados contra HVB1/DBV, vírus sincicial respiratório bovino e parainfluenza 3 (Tab. 4), neutraliza, 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 permanentemente. Isso pode explicar essa discreta melhor taxa de fertilidade e o menor intervalo de partos nos rebanhos leiteiros do tipo A/B. Outro fato interessante foi o desconhecimento, à época das coletas das amostras, de informações sobre o parasito por parte dos veterinários e produtores, e isso, conseqüentemente, subestimava as potenciais perdas produtivas e reprodutivas causadas por *N. caninum*. Os rebanhos 4 e 6 foram os que apresentaram maior grau de tecnologia para produção, alto trânsito de animais e maior quantidade de eventos de vacinação (dados não publicados), o que foi diretamente proporcional à freqüência de anticorpos para *N. caninum* encontrada, já que foram os dois rebanhos que apresentaram maiores ocorrências de anticorpos para o parasito (Tab. 1). Inclusive, o manejo dos dois rebanhos era semelhante, sendo o rebanho 6 derivado do rebanho 4, e apesar de estarem em municípios distintos, a cerca de 250 km, mantiveram o mesmo padrão de distribuição de anticorpos para o parasito.

Com relação ao único rebanho negativo (Tab. 1), este era pequeno e, devido às facilidades encontradas durante a ocasião da visita à propriedade, foi amostrada 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 com relação aos outros rebanhos leiteiros do tipo A/B. O título sorológico de anticorpos para

N. caninum varia de acordo com o estado gestacional, podendo ondular conforme a recrudescência de auto-infecções 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., 1995; 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 (Tab. 5). Sabe-se que a silagem mofada pode conter agentes imunossupressores, que podem facilitar a recrudescência da infecção pelo parasito, facilitada pelo rompimento da parede de cistos teciduais, originando uma auto-reinfecção do animal pelos bradizoítos do coccídio (Bartels et al., 1999). 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 (Tab. 5). Parece que infecções horizontais pelo acesso ao pasto não são, por certo, responsáveis significativamente pelas freqüências encontradas neste estudo.

A contaminação da silagem por fungo é considerada um fator de risco potencial, porque micotoxinas podem ser produzidas, e estas 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 verificado 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 preconizada (McAllister et al., 1998a; 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 neste trabalho, isso tem sido amplamente relatado como fator de risco de infecção pós-natal por *N. caninum* em rebanhos bovinos (Paré et al., 1998; Bartels et al., 1999; Wouda et al., 1999b; Dijkstra et al., 2001a). 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 relatado que *N. caninum* pode estabelecer a infecção em bovinos em um relativamente curto período de tempo, especialmente quando os animais estão submetidos a condições estressantes, como no caso de transporte e novo ambiente (Suteeraparp et al., 1999). Em 50% dos rebanhos leiteiros do tipo A/B foi relatado trânsito intenso, onde existiam animais importados da Austrália, do Canadá e dos EUA (dados não publicados). Cinquenta por cento dos rebanhos produtores de leite tipo C eram "fechados" (Tab. 5). Entretanto, em um desses rebanhos, a importação de vacas do Uruguai era

constante, bem como a aquisição de animais em leilões (dados não publicados). Em todos esses países de onde foram relatadas as importações, *N. caninum* já foi descrito (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 com relação a *N. caninum*, mesmo em 1996, quando começou a coleta dessas amostras, e 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 leiteiros do tipo 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 bovinos da raça Holandês de linhagens inferiores; dois rebanhos eram de outras raças de 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 neste trabalho.

A complexa natureza de alguns fatores estressores nos modernos ambientes das fazendas atuais simultaneamente expõe 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 estes afetam os mecanismos que controlam as eficiências reprodutivas e produtivas dos animais (Dobson & Smith, 2000).

CAPÍTULO IV

INFECÇÃO POR *Neospora caninum* ASSOCIADA ÀS INFECÇÕES PELO HERPES-VÍRUS BOVINO 1 E VÍRUS DA DIARRÉIA BOVINA A VÍRUS EM BOVINOS EM MINAS GERAIS

INTRODUÇÃO

Neospora caninum (Apicomplexa: Toxoplasmatinae) é um coccídio do cão (McAllister et al., 1998a) que tem o bovino como um dos seus hospedeiros intermediários (Thilsted & Dubey, 1989). O abortamento tem sido a principal consequência da presença do parasito nos rebanhos bovinos (Anderson et al., 2000), mas, também, vacas soropositivas são descartadas, devido à baixa produção leiteira, em até seis meses antes que as soronegativas, bem como o risco de uma vaca soropositiva ser descartada é duas vezes maior que vacas soronegativas (Thurmond & Hietala, 1996). O impacto econômico da infecção por *N. caninum* em vacas leiteiras pode incluir, ainda, baixos lucros associados à reduzida produção de leite, em adição aos custos associados aos abortamentos e ao descarte prematuro. Uma vaca soropositiva pode deixar de produzir até 346 kg de leite num período de lactação de 305 dias (Thurmond & Hietala, 1997). A neosporose tem distribuição mundial e é altamente prevalente na América do Norte (Anderson et al., 2000).

O herpes-vírus bovino 1 (HVB 1) tem sido implicado em problemas respiratórios, genitais e, principalmente, abortamentos em bovinos. Tais síndromes estão, hoje, amplamente distribuídas e com alta prevalência em rebanhos bovinos de todo o mundo (Mickelsen & Evermann, 1994). O vírus da diarréia bovina a vírus (VDBV) é um pestivírus que tem sido responsabilizado por repetições de cio, abortamentos, fetos mumificados, infertilidade, queda brusca nos índices de produção dos rebanhos, teratogenia e diminuição nos índices de

fecundação dos rebanhos bovinos (Moenning & Liess, 1995).

Minas Gerais possui o maior rebanho leiteiro do Brasil, com 8.807.731 cabeças, sendo 3.081.025 vacas leiteiras, com uma produção anual de 5,8 bilhões de litros em 2000 (Anuário da Pecuária Brasileira, 2001). Nos bovinos do estado, tem sido relatada a presença de anticorpos para agentes virais abortivos como VDBV (Castro et al., 1992), HVB 1 (Melo, 1998) e, mais recentemente, anticorpos para *N. caninum*.

Em Minas Gerais, anticorpos para *N. caninum* foram relatados, inicialmente, por Melo & Leite (1999), quando foram detectadas três vacas soropositivas em dois rebanhos leiteiros com problemas de abortamento.

Este trabalho objetivou analisar a frequência de infecção por *N. Caninum*, associada às infecções pelos HVB1 e VDBV em vacas leiteiras infectadas naturalmente, de três agentes infecciosos e, também, determinar a prevalência de infecção por *N. caninum* em vacas leiteiras vacinadas contra esses dois vírus.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudados dois grupos de rebanhos leiteiros localizados em diferentes municípios de Minas Gerais (ANEXO IV): no grupo I, foram analisados 15 rebanhos (476 amostras de soro de bezerras, novilhas e vacas) infectados naturalmente e não vacinados contra HVB 1 e VDBV, objetivando determinar a frequência de infecção por *N. caninum*; no grupo II, foram analisados três rebanhos (100 vacas) vacinados contra esses

dois agentes virais, para determinar a prevalência de infecção pelo protozoário. Foram testadas amostras de animais com idade acima de seis meses, na tentativa de excluir anticorpos passivos. A ocorrência de abortamentos não foi usada como critério para selecionar os animais ou os rebanhos estudados.

No cálculo do número de amostras necessárias para determinação da frequência de infecção por *N. caninum* no grupo I, foi utilizado o programa EPI-INFO, versão 6.0 (Statcalc calculator - Sample size & power - Population survey), elaborado por Dean et al. (1994). O cálculo foi baseado na fórmula apresentada por Kish & Leslie (1965) para estudo populacional, no qual a amostragem foi feita de forma aleatória para cada estrato da população. A frequência de animais positivos nos exames foi estimada em 11%, o erro aceitável em 3% e o nível de confiança em 95%. De acordo com as estimativas apresentadas, seria necessária uma amostragem de 302 animais em uma população total de 2.838 animais.

No grupo II, o número mínimo de amostras (n=96) foi determinado utilizando prevalência crítica (50%), intervalo de confiança de 95% e margem de erro de 10% (Thrusfield, 1986). Pelo método de amostragem aleatória simples, foram coletadas, em março de 1997, 100 amostras de soro sanguíneo de vacas vacinadas contra HVB1 e VDBV, em três rebanhos.

O sangue foi coletado uma única vez em cada animal, por punção das veias coccígea ou jugular com agulhas descartáveis e tubos de vidro a vácuo, sem aditivos. Em cada rebanho, todas as amostras foram coletadas em um único dia, e após a coleta as amostras foram imediatamente transportadas ao Laboratório do DMVP - EV - UFMG (Belo Horizonte, Minas Gerais), para coleta do soro. Para isso, foram centrifugadas a 1.000 x g por 10 minutos, sendo o soro separado em alíquotas e estocado a -20 °C até o uso.

Na detecção de anticorpos para *N. caninum*, foi utilizado um ELISA indireto comercial⁵, de acordo com as recomendações do fabricante. A leitura das placas foi realizada num aparelho automático⁶ em filtro de 620 nm. Esse teste é derivado de um ELISA originalmente descrito por Paré et al. (1995a), sendo o resultado 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 os ≥ 0,50, positivos. A sensibilidade desse ELISA foi relatada ser de 98% e a especificidade, de 87-92% (Wouda et al., 1998), havendo quase que perfeita concordância em comparação com o "imuno-blotting" (Schaes et al., 1998).

As amostras foram submetidas ao teste de soroneutralização em microplacas (Office International des Epizooties - O.I.E., 1992), para detecção de anticorpos para HVB 1 e VDBV. Amostras virais de referência foram utilizadas: para o HVB 1, utilizou-se a cepa viral IBR - Colorado 1⁷, com título de 10^{5,5} log₂ em 50 µl (100 TCID₅₀); e para o VDBV, foi utilizada a cepa viral NADL⁸, com título da suspensão viral de 10^{3,57} log₅ em 50 µl (100 TCID₅₀). Os títulos virais foram estabelecidos a partir de diluições decimais e calculados pelo método de Reed & Muench (Burlison et al., 1992). No teste para HVB 1, foram usadas células de linhagem contínua de rim de macaco (MDBK⁹) e para o VDBV, células de cultivo primário de pulmão fetal bovino (PFB). As células foram cultivadas em Meio Essencial Mínimo¹⁰ com sais de Eagle, 20 mM de HEPES, 1 U.I./ml de penicilina, 0,5 mg/ml de estreptomicina e 5 mg/ml de anfotericina

⁵ HerdCheck[®], IDEXX Laboratories, Inc., USA.

⁶ Labsystems Multiscan MS, Finland.

⁷ ATCC - VR 864.

⁸ ATCC - VR 1.422.

⁹ ATCC - CCL 864.

¹⁰ MEM - Sigma Laboratories.

B (Fungisona[®] - Squibb.) suplementados com 5% de soro fetal bovino.

Para determinar se houve relação entre a frequência de soropositividade de *N. caninum* e as frequências de soropositividade dos agentes virais, foi realizado o teste de dispersão de frequências (χ^2) no programa EPI INFO, versão 6.04b (Dean et al., 1994). A diferença foi considerada significativa quando $P < 0,05$ (Sampaio, 1998).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A quantidade de amostras testadas, a quantidade de amostras positivas e a porcentagem para os três agentes infecciosos observados individualmente em cada rebanho, bem como a porcentagem total de soropositividade do grupo I, estão apresentadas na Tab. 6.

A quantidade de amostras positivas para os três agentes de formas isolada e associada, bem como as suas porcentagens nos rebanhos do grupo I, é apresentada na Tab. 7.

Tabela 6 - Quantidade de amostras testadas, amostras positivas e porcentagem de positivas para os três agentes infecciosos observados individualmente em cada rebanho do grupo I

Rebanho	Total de Amostras/ Rebanho	Amostras Positivas <i>N. caninum</i>	Porcentagem de Positivos <i>N. caninum</i>	Amostras Positivas HVB 1	Porcentagem de Positivos HVB 1	Amostras Positivas VDBV	Porcentagem de Positivos VDBV
1	41	3	7,32	20	48,78	30	73,17
2	28	2	7,14	0	0,00	3	10,71
3	29	6	20,69	4	13,79	2	6,90
5	45	4	8,89	15	33,33	3	6,67
7	18	4	22,22	4	22,22	15	83,33
9	27	1	3,70	0	0,00	4	14,81
12	64	4	6,25	5	7,81	0	0,00
13	27	1	3,70	16	59,26	0	0,00
14	50	11	22,00	34	68,00	28	56,00
15	18	1	5,56	16	88,89	6	33,33
16	29	3	10,34	6	20,69	12	41,38
19	40	6	15,00	30	75,00	16	40,00
22	34	12	35,29	2	5,88	5	14,71
23	13	2	15,38	5	38,46	6	46,15
24	13	0	0,00	5	38,46	5	38,46
Total	476	60	12,61 ^b	162	34,00 ^a	135	28,30 ^a

Porcentagens seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem entre si ($P < 0,001$).

Tabela 7 - Comparação entre a quantidade de amostras soropositivas para *N. caninum* e a quantidade de amostras soropositivas de forma associada por dois ou mais agentes infecciosos nos rebanhos do grupo I

	Total de Amostras	<i>N. caninum</i>	<i>N. caninum</i> HVB 1	<i>N. caninum</i> VDBV	HVB1 VDBV	<i>N. caninum</i> HVB1/VDBV
Quantidade de amostras positivas	476	60	21	15	110	40
Porcentagem de positivas		12,61 ^b	4,41 ^d	3,15 ^d	23,11 ^a	8,41 ^c

Letras diferentes na mesma linha diferem entre si (P<0,05).

Nas amostras testadas do grupo II, observou-se que 46 (46%) foram positivas para *N. caninum* (intervalo de confiança - IT para a prevalência no mês de março de 1997, variando de 43,7 a 48,3%). Quanto à titulação das amostras para HVB 1, foi observada prevalência de 85% de soropositividade (IT - 76,5 e 93,5%), e os títulos variaram de 1:4 a > 1:512. Para VDBV, a prevalência foi de 76% (IT - 72,2 e 79,9%), e os títulos variaram de 1:5 a > 1:640. A quantidade de amostras testadas e de positivas e a porcentagem para

os três agentes infecciosos estudados nesses três rebanhos são apresentadas na Tab. 8.

Quanto à observação da ocorrência das associações entre os patógenos na Tab. 9 são apresentadas a comparação entre a quantidade de amostras positivas e porcentagem para *N. caninum* e a quantidade de amostras soropositivas de forma associada por dois ou mais agentes infecciosos estudados e a porcentagem para os rebanhos do grupo II.

Tabela 8 - Quantidade de amostras testadas, amostras positivas e porcentagem de positivas para os três agentes infecciosos observados individualmente em cada rebanho do grupo II

Rebanho	Total de Amostras/ Rebanho	Amostras Positivas <i>N. caninum</i>	Porcentagem de Positivos <i>N. caninum</i>	Amostras Positivas HVB 1	Porcentagem de Positivos HVB 1	Amostras Positivas VDBV	Porcentagem de Positivos VDBV
4	33	24	72,73	33	100,00	22	66,67
6	23	11	47,83	23	100,00	23	100,00
8	44	11	25,00	29	65,91	31	70,45
Total	100	46	46,00 ^b	85	85,00 ^a	76	76,00 ^a

Letras diferentes na mesma linha diferem entre si (P<0,05).

Tabela 9 - Comparação entre a quantidade de amostras positivas para *N. caninum* e a quantidade de amostras positivas de forma associada por dois ou mais agentes infecciosos para os rebanhos do grupo II

	Total de Amostras	<i>N. caninum</i>	<i>N. caninum</i> HVB 1	<i>N. caninum</i> VDBV	HVB1 VDBV	<i>N. caninum</i> HVB1/VDBV
Porcentagem de Positivos	100	46 ^a	10 ^d	4 ^d	39 ^{a, b}	29 ^b

Letras diferentes na mesma linha diferem entre si (P<0,05).

Quanto à frequência de infecção pelo protozoário, foi comparada com a frequência das associações entre os agentes infecciosos; nos rebanhos do grupo I, observou-se que a infecção por *N. caninum* isoladamente foi maior ($P < 0,05$) do que as frequências das associadas entre *N. caninum*/HVB1 e *N. caninum*/VDBV e, ainda, maior ($P < 0,05$) do que a associação *N. caninum*/HVB1/VDBV. A frequência de infecção por *N. caninum* não diferiu ($P > 0,05$) da frequência da associação HVB 1/VDBV, nos rebanhos testados (Tab. 7). Nesse mesmo sentido, Bartels et al. (1999) não encontraram qualquer relação entre surtos de abortamento associados com *N. caninum* e infecção por VDBV, HVB 1, *L. hardjo* e *Salmonella dublin*, baseados nos resultados de soroprevalência de rebanhos para essas infecções. Quando foram comparadas as frequências de infecção pelas associações *N. caninum*/HVB1 e *N. caninum*/HVB1/VDBV, esta última foi maior e pode ter sido influenciada pela presença do VDBV (Tab. 7). Tem sido relatado o fato de o VDBV estimular a imunossupressão por destruição linfocitária (Guy & Potgieter, 1985). Fatores como gestação avançada, estresse e infecção pelo VDBV podem afetar a habilidade do animal em manter uma efetiva resposta imune e, com isso, predispor a reativação da infecção por *N. caninum* (Cox et al., 1990).

Com relação ao alto risco de transmissão do parasito ao feto, em vacas naturalmente infectadas, e a produção de anticorpos em vacas gestantes, um paralelo pode ser traçado entre VDBV e *N. caninum* quando, pelo VDBV, há uma estimulação pelo feto infectado para que a mãe produza anticorpos (Stenlund et al., 1999). Os títulos de anticorpos em mães de bezerros congenitamente infectados com VDBV aumentaram continuamente até a parição, após o que a quantidade de anticorpos diminuiu. No último trimestre, a quantidade de anticorpos foi significativamente maior que naquelas vacas que tinham os fetos não infectados. Parece que a dinâmica da produção de anticorpos para VDBV e para *N.*

caninum é semelhante (Lindberg et al., 1997). Um bezerro torna-se imunotolerante ao *N. caninum* quando a infecção é iniciada durante a maturação do sistema imune ou quando o parasito é transferido passivamente ao bezerro, após o nascimento, pelo leite materno (Innes et al., 2001). No VDBV, quando o feto é infectado antes dos 100 dias de gestação, o bezerro nasce persistentemente infectado com o vírus, mas é imunotolerante a ele. Entretanto, se a infecção ocorre ao redor da metade da gestação, o feto já adquiriu a capacidade de montar uma resposta imune ao vírus, e muitos bezerros nascem com altos títulos de anticorpos específicos ao VDBV circulante (Nettleton & Entrican, 1995).

A maioria dos rebanhos do grupo I (66,67%) foi infectada pelos três agentes. A frequência de infecção por *N. caninum* foi menor do que a de infecção pelo HVB 1 e VDBV. Isso pode ser explicado, provavelmente, por diferenças na forma de disseminação dos agentes infecciosos.

No caso de *N. caninum*, a principal forma de infecção, a forma vertical, é relativamente comum (Buxton et al., 1997), sendo responsável por até 95% das infecções (Paré et al., 1996; Björkman et al., 1996), e a forma horizontal tem sido considerada um evento raro (Hietala & Thurmond, 1999), exceto quando há forte exposição de todos os animais do rebanho, pela contaminação pontual com oocistos do parasito (Mainar-Jaime, 1999). Vários estudos têm indicado que o tempo em que ocorre a parasitemia na gestação é crítico para o desenvolvimento da neosporose, bem como a idade gestacional do feto à época da transmissão (Buxton et al., 1998; Williams et al., 2000; Innes et al., 2001).

Os agentes virais disseminam-se de forma epidemiologicamente importante, principalmente pela transmissão por aerossóis. No caso do HVB 1, ele é introduzido em rebanhos, principalmente, pela aquisição de bovinos que estejam com o

vírus no período de incubação ou na fase aguda da infecção e por animais infectados latentemente. Outras formas de introdução são, provavelmente, eventos raros. Um animal infectado dissemina o HVB 1 para novos animais susceptíveis após um período de até 16 dias depois da infecção, e, quando quase todos os animais do rebanho estiverem infectados, eles desenvolvem imunidade ao HVB 1 ativo e o curto ciclo de infecção termina. A disseminação do HVB 1 é mais devida às infecções respiratórias e menos a infecções do trato genital. Após a fase aguda da infecção, o vírus permanece latente em animais imunes, nos núcleos dos neurônios (trigeminal/sacral), e pode ser reativado após prolongados períodos de latência, tornando a induzir infecções primárias em novos animais susceptíveis. Vacas ou novilhas infectadas latentemente podem reexcretar o vírus durante o parto. Os seus bezerros podem tornar-se infectados e transmitir o vírus aos outros grupos da fazenda ou a outros rebanhos (Wentinck et al., 1993).

No grupo I, a frequência de infecção pelos dois vírus não diferiu ($P > 0,05$) (Tab. 6), e isso indica que, provavelmente, a forma de infecção seja semelhante. Entretanto, a disseminação do protozoário parece ser bem mais lenta do que a disseminação do HVB1 e VDBV. Provavelmente, isso seja uma das explicações para os resultados obtidos na análise dos 15 rebanhos infectados naturalmente.

No caso da infecção natural, não houve diferença ($P > 0,05$) entre as associações *N. caninum*/HVB 1 e *N. caninum*/VDBV (Tab. 7). Entretanto, o fato de a latência ter extrema importância tanto para *N. caninum* quanto para HVB 1 (Wentinck et al., 1993; Wouda et al., 1999^a; Dijkstra et al., 2001b) pode ser um forte ponto de ligação epidemiológica entre esses dois agentes, por serem estimulados a reinfestar o próprio animal em razão, principalmente, dos fatores imunossupressores, como transporte (Suteeraparp et al., 1999), ingestão de silagem

(Bartels et al., 1999) e administração de corticóides ou indução da liberação de cortisona pelo organismo (Gibbs & Rweyemamu, 1977; Dobson & Smith, 2000). Aparentemente, apenas pequena porcentagem de bezerros congenitamente infectados por *N. caninum* desenvolve a neosporose clínica, e a sobrevivência de bezerros infectados congenitamente é tão alta quanto a de bezerros não-infectados (Paré et al., 1996).

Neospora caninum pode ser implicado falsamente como causa de abortamentos epidêmicos quando o diagnóstico é baseado apenas nos resultados de histopatologia fetal ou imuno-histoquímica. Thurmond et al. (1997) encontraram forte associação entre *N. caninum* e elevados títulos para serovares de *Leptospira* em um rebanho e elevados títulos para VDBV em outros três, na Califórnia. Os achados de recentes envolvimento do VDBV e a subsequente confirmação de abortamentos atribuídos à leptospirose indicaram que outros agentes infecciosos devem ser considerados rotineiramente nos planos de diagnóstico de epidemias de abortamento em que *N. caninum* foi suspeito. Embora a ligação casual entre *N. caninum* ou outros possíveis agentes abortivos e o abortamento possa ser feita apenas de forma aproximada, o uso de uma sorologia retrospectiva pode prover evidências para uma associação. Nesse caso, *N. caninum* não foi uma causa suficiente dessa epidemia. O abortamento pode ser consequência da exposição a um agente abortivo que causou a morte fetal em vacas soropositivas ou soronegativas. Assim, torna-se importante o conhecimento do estado sorológico da vaca antes do abortamento.

Otter & Wilson (1997) encontraram associação de *N. caninum* com HVB 1 e infecção associada VDBV/*N. caninum* em abortamentos bovinos. Esses casos indicaram que a investigação de abortamentos deve ser feita de forma abrangente, e a sorologia para os vírus deve ser confirmada de forma pareada. Por isso, deve-se encorajar os veterinários de campo a submeter amostras de

soro, fetos e placentas de forma que permita testes laboratoriais amplos.

No grupo II, a prevalência de infecção por *N. caninum*, apesar de ter sido inferior à prevalência de soropositividade para os dois vírus, foi considerada alta. Isso pode ter ocorrido devido a uma maior proteção dos animais contra os agentes virais em razão da forte resposta imune conferida pelos anticorpos vacinais, maximizando a infecção pelo protozoário. A falta de medidas profiláticas contra *N. caninum* nos rebanhos estudados e as tentativas realizadas de contornar os prejuízos causados pelos vírus também podem ter influenciado esses dados.

A prevalência de infecção por *N. caninum* no grupo II foi maior do que todas as associações com os agentes virais (Tab. 9), e nesses rebanhos havia sérios problemas de abortamentos (dados não publicados). *N. caninum*, até então, era subestimado como causador de prejuízos, pelo próprio desconhecimento à respeito do parasito, que não tinha sido levado em consideração como agente etiológico de perdas reprodutivas, mostrando-se, pelo menos sorologicamente, presença marcante. Entretanto, uma confirmação etiológica definitiva não foi realizada, sendo esse apenas um diagnóstico presuntivo. Torna-se clara a necessidade de acurar-se os meios de diagnóstico diferencial para os agentes abortivos de bovinos, evitando-se a implantação de medidas profiláticas e até mesmo curativas, que representem elevados custos para os pecuaristas, que nem sempre são as mais corretas e indicadas. Outra situação observada foi aquela em que produtos biológicos são postos em dúvida quanto à sua eficácia e na realidade, muitas vezes, são mal prescritos ou mal administrados. Isso ocorreu no grupo II, quando, mesmo os animais tendo sido vacinados contra VDBV e HVB1, os episódios de abortamento continuaram a ocorrer.

A associação sinérgica de patógenos provavelmente altera a epidemiologia da infecção por *N. caninum* em vacas leiteiras. Alguns exemplos de que sinergismos desse tipo podem ocorrer são observados em pacientes humanos, principalmente naqueles infectados pelo vírus HIV, em que infecções concomitantes por *T. gondii*, *Cryptosporidium parvum* e *Isospora belli* são exacerbadas pela condição imunossupressora desse retrovírus (Current et al., 1990).

A correlação desses dados é difícil, e a associação entre os patógenos deve dificultar os programas de melhoria da qualidade sanitária dos rebanhos, principalmente em relação ao descarte de vacas soropositivas. Provavelmente, medidas que minimizem a reativação dos agentes latentes, bem como as que minimizem a transmissão destes, devam ter prioridade.

**SOROLOGIA PARA *Neospora caninum* EM CANÍDEOS SILVESTRES
SUL-AMERICANOS**

INTRODUÇÃO

Neospora caninum (Apicomplexa: Toxoplasmatinae) é um protozoário relatado em cães, que apresentaram sintomatologia semelhante àqueles infectados pelo *Toxoplasma gondii* (Dubey et al., 1988a). Em cães infectados têm sido relatados problemas neurológicos, polimiosite, miocardite e dermatites ulcerativas e piogranulomatosas (Dubey et al., 1998; Dubey et al., 1995; Barber & Trees, 1996). O cão, além de hospedeiro intermediário (Wouda et al., 1999; Mineo et al., 2001), foi reconhecido como hospedeiro definitivo do parasito (McAllister et al., 1998a; Lindsay et al., 1999). Ovinos, caprinos, bovinos, búfalos e cavalos são naturalmente expostos à infecção, ao passo que macacos, gerbils, camundongos, ratos e porcos foram suscetíveis à infecção experimental. Esse parasito tem distribuição mundial (Dubey, 1999).

O parasito vem sendo pesquisado com o intuito de esclarecer a sua relação com espécies selvagens, principalmente objetivando verificar a importância desses animais num provável ciclo de vida no meio selvagem. O coioote (*Canis latrans*) (Lindsay et al., 1996), o dingo-australiano (*C. familiaris dingo*) (Barber et al., 1997), a raposa-vermelha (*Vulpes vulpes*) (Barber et al., 1997; Buxton et al., 1997; Simpson et al., 1997) e a raposa-cinzenta (*Urocyon cinereoargenteus*) (Lindsay et al., 2001) se mostraram naturalmente suscetíveis ao parasito. A exposição de lobos-guarás (*Chrysocyon brachyurus*) (Illiger, 1811) e cachorros-do-mato (*Cerdocyon thous*) (Linnaeus, 1758) ao *N. caninum* é desconhecida. Este trabalho tem como objetivo pesquisar anticorpos IgG para *N.*

caninum em lobos-guarás e cachorros-do-mato provenientes de zôos e de vida livre.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de sangue foram coletadas por punção venosa em 48 lobos-guarás e dois cachorros-do-mato, após obtenção de licença prévia do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). As amostras dos lobos foram coletadas ao longo de 1997, sendo nove de animais provenientes do Parque Natural da CBMM, Araxá, MG, 13 da Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte, MG, oito do Jardim Zoológico de Brasília, DF, oito do Zoológico de Curitiba, PR, duas da Fundação Rio-Zôo, RJ, e quatro amostras de animais capturados em vida livre na região dos Municípios de Uberlândia e Andradas, ambos em Minas Gerais. Os lobos-guarás provenientes dos zôos eram de idades variadas, e os quatro animais capturados na natureza tinham idade inferior a um ano. As amostras de cachorro-do-mato foram coletadas na sede do IBAMA em Belo Horizonte, em novembro de 2000. Os animais eram adultos, tinham sido capturados recentemente e estavam em quarentena. As amostras dos cachorros-do-mato e dos lobos-guarás foram alíquotadas e armazenadas a -20 °C até o uso.

Para realização dos exames, os soros foram testados à temperatura ambiente e individualmente para a presença de IgG, num teste de imunofluorescência indireta (TIFI) comercial¹¹, com controles de cão e anti-soro policlonal de IgG anticanino, de origem caprina, conjugado com isotiocianato

¹¹ VMRD - Pullman/USA.

de fluoresceína. Os testes foram realizados de acordo com o fabricante, e as amostras foram testadas em diluição de 1:50 em lâminas de 12 poços que continham taquizoítos cultivados em células VERO e fixados em superfície de teflon. Após o término das reações, as lâminas foram montadas com glicerol e lamínulas, sendo a leitura realizada imediatamente em microscópio com emissão ultravioleta¹² em 250 X e confirmada em 400 X. As amostras foram analisadas quanto à uniformidade da fluorescência dos taquizoítos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em nenhuma das amostras testadas foi visualizada a fluorescência específica para *N. caninum*, não sendo detectada infecção evidente por *N. caninum*. Devido à indisponibilidade de soros-controles das espécies testadas, foram utilizados soros positivo e negativo de cão para referenciar os testes. Em todas as lâminas, houve um poço com soro positivo de cão, em que na diluição de 1:50 se observou uma completa fluorescência periférica dos taquizoítos. Em alguns soros testados, a presença de fluorescência apical (não específica) não foi considerada, devido à possibilidade de reações cruzadas com outros protozoários (Paré et al., 1995).

A ocorrência natural de anticorpos para *N. caninum* em cães tem sido relatada em prevalências variáveis (Barber et al., 1997; Sawada et al., 1998; Wouda et al., 1999b; Mineo et al., 2001). Os trabalhos de McAllister et al. (1998) e Lindsay et al. (1999) evidenciaram que, mesmo soronegativos ao TIFI, alguns cães infectados experimentalmente excretaram oocistos de *N. caninum* nas fezes. Populações silvestres de mamíferos, principalmente canídeos, não têm sido testadas adequadamente para determinar se

também são hospedeiras definitivas de *N. caninum* (McAllister et al., 1999).

O lobo-guará é o maior canídeo da América do Sul e uma das espécies mais típicas do cerrado brasileiro, podendo também ser encontrado em campos de altitude e áreas de banhados e brejos. Seu comportamento é distinto do de outras espécies de canídeos, por possuir hábitos crepusculares e oportunistas quanto à alimentação: onívora e sazonal, composta por pequenos roedores, aves e frutos silvestres. Essa espécie é classificada como ameaçada de extinção por instituições como "The World Conservation Union" (IUCN) e pelo "II Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora". No Brasil, está presente na lista oficial da fauna brasileira ameaçada de extinção desde 1989 e na lista de espécies ameaçadas de extinção de Minas Gerais - espécie sujeita à extinção na natureza em médio prazo (Maia et al., 1999).

O cachorro-do-mato vive em campos e cerrados de quase toda a América do Sul, inclusive no Brasil, e é o canídeo mais comum no continente. Possui hábito noturno e vive solitário ou aos pares¹³. A sua alimentação depende da estação; na Venezuela, observou-se ser composta, durante a estação de chuvas, de 54% de insetos e 20% de vertebrados e, na estação seca, de 48% de vertebrados, 31% de caranguejos e 16% de insetos¹⁴. Apesar de essa espécie ser classificada no plano de ação para conservação de espécies ameaçadas do IUCN/SSC do "Canid Specialist Group", de 1990, como espécie

¹³

http://www.pbh.gov.br/zoobotanica/zoo/mamifero/cach_mato.htm

¹⁴

http://www.furry.de/suran/fox_db/Cerdocyon_thous.html

¹² Olympus CBA, Japan.

que não requer proteção imediata¹⁵ e não está ameaçada de extinção, é protegida pela legislação ambiental brasileira por pertencer à fauna nativa.

O fato de as espécies testadas serem onívoras e suas dietas variarem de acordo com as estações e a disponibilidade de presas interfere, provavelmente, nas taxas de ocorrência e exposição a *N. caninum*. A situação dos componentes vertebrados que fazem parte das dietas em relação a *N. caninum* é desconhecida. Provavelmente, são espécies que apresentam baixa prevalência para o parasito ou mesmo nenhuma. A situação do lobo-guará e do cachorro-do-mato em relação a *N. caninum* necessita de maiores estudos, principalmente para o primeiro, que é uma espécie ameaçada de extinção e altamente suscetível aos patógenos comuns de cães, como o vírus da cinomose (Cabasso et al., 1956), que leva aos sintomas de ordem neurológica, mortalidade nos lobos e pode ter a neosporose como diagnóstico diferencial. A devastação dos territórios dos lobos tem como consequência uma maior proximidade com os cães das áreas rurais, e isso aumenta o grau de exposição aos patógenos caninos. Outras formas infectantes do parasito não foram pesquisadas, o que não exclui a possibilidade de essas espécies participarem do universo do parasito, terem alguma importância epidemiológica no ciclo do *N. caninum* e servirem de fontes de infecção no meio silvestre.

De acordo com o teste realizado, os lobos-guarás e os cachorros-do-mato testados não foram expostos à infecção por *N. caninum*. Entretanto, ambas as amostragens foram pequenas, e os dados podem estar subestimados, não refletindo, necessariamente, a realidade das populações

dessas duas espécies diante de *N. caninum*. Além disso, como a especificidade e a sensibilidade do teste ainda não foram estabelecidas para essas espécies, a interpretação do significado desses resultados deve ser feita com cautela.

15

<http://www.canids.org/1990cap/conclusn.htm#crabfox>

CONSIDERAÇÕES FINAIS E REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A ausência de referências a respeito de infecção por *N. caninum* em rebanhos bovinos mineiros, bem como o desconhecimento da situação dos carnívoros da fauna brasileira quanto à neosporose, tornou oportuna a realização deste projeto.

Os prejuízos causados em decorrência de infecção por *N. caninum*, principalmente à bovinocultura, a ausência de conhecimentos relacionados ao ciclo de vida e o desenvolvimento de drogas comercialmente viáveis e produtos biológicos que minimizem essas perdas têm justificado o crescente número de pesquisas relacionadas a *N. caninum*. O estabelecimento de uma padronização interlaboratorial de testes diagnósticos, para que sejam minimizados os falsos diagnósticos, também se tornou uma necessidade no panorama mundial.

As dificuldades encontradas nos experimentos de campo que mensurem os custos de infecções em rebanhos são barreiras difíceis de serem transpostas, e isso, geralmente, torna-se um entrave à realização de estudos reais. As simulações por computador têm sido uma boa opção.

Os achados desta pesquisa, apesar de ter sido observado um rebanho soronegativo, evidenciam a ampla exposição dos rebanhos bovinos ao parasito. De acordo com vários estudos, de forma geral, provavelmente um modelo de disseminação epidemiológica por transmissão vertical seja o responsável pela distribuição da infecção nos estratos etários dos rebanhos estudados. Fatores como confinamento, estresse, transporte dos animais, maior taxa de reposição dos animais no rebanho, infecções associadas a outros patógenos e tipo de produção de leite provavelmente predisponham e maximizem

a infecção por *N. caninum* nos rebanhos estudados. Outro dado de extrema importância foi aquele em que foi registrada alta soropositividade para o protozoário em rebanhos vacinados contra agentes virais abortivos. Nesses rebanhos, eram destinados valores consideráveis nos programas de vacinação contra HVB 1 e VDBV, e mesmo assim os abortamentos continuavam. A necessidade do estabelecimento de diagnóstico etiológico bem feito por um amplo inquérito sorológico, atualização e concientização dos profissionais ligados à sanidade animal de enviar fetos, anexos fetais e soro das matrizes o mais rapidamente aos laboratórios credenciados, o estabelecimento e manutenção de um banco de soros com o intuito de garantir um estudo sorológico retrospectivo, quando necessário, do rebanho têm sido amplamente sugeridos em artigos recentes.

A questão do conhecimento do ponto ideal de utilização do potencial individual de cada animal parece ser essencial para que a produtividade ótima seja expressa sem comprometer o perfil sanitário do rebanho e, assim, a atividade leiteira seja maximizada. As condições estressantes a que são submetidos os rebanhos das explorações leiteiras predis põem à excreção de agentes patogênicos latentes, como HVB 1, bem como induzem a reinfeção dos animais cronicamente infectados por *N. caninum*.

Apesar de não ter sido encontrado infecção nos lobos-guarás e nos cachorros-do-mato estudados, não se podem descartar essas espécies do ciclo de vida parasitária de *N. caninum*, mesmo porque, apesar de não terem soroconvertido, cães infectados experimentalmente por ingestão oral de camundongos contaminados pelo parasito

excretaram oocistos nos trabalhos de McAllister et al. (1998) e Lindsay et al. (1999). A possibilidade de isso também acontecer com outros canídeos não deve ser descartada. Por isso, outras amostras provenientes de lobos de vida livre serão testadas no futuro, com o intuito de encontrar indícios de infecção por *N. caninum* (ANEXO II, PRANCHA II).

Os gerbils inoculados com a cepa Illinois de *N. caninum* mostraram-se altamente suscetíveis à neosporose e, como em outros experimentos relatados por outros autores, podem servir de modelo experimental para estudos desse protozoário. Além disso, mostraram-se animais altamente prolíferos, limpos e mansos, o que contribuiu para viabilizar a manutenção dos experimentos (ANEXO II, PRANCHA III).

Na tentativa de isolamento de oocistos nas fezes de cães filhotes soronegativos para *N. caninum* e que sempre, e unicamente, se alimentaram de ração comercial, inoculados oralmente com tecido cerebral de vacas soropositivas e com um sólido histórico de abortamento, não se obteve sucesso. Isso também ocorreu em outros estudos realizados no Canadá, em que os autores relataram a dificuldade dos carnívoros de atingir um tecido fortemente protegido pelo crânio. Portanto, a sobrevivência dos taquizoítos e cistos poderá ser mais rapidamente prejudicada em decorrência da autólise mais rápida nessa área do corpo (ANEXO II, PRANCHA IV).

No cultivo celular, ambas as cepas se adaptaram perfeitamente à amostra de células VERO (ATCC CCL-81), bem como ao meio de cultivo utilizado (MEM) e ao soro fetal bovino (10%). Foram realizadas 15 passagens, com o objetivo de estudar o comportamento dos taquizoítos no cultivo, sendo a cepa Illinois mais virulenta que a cepa Beef. A primeira destruiu mais fortemente todas as áreas da monocamada celular, enquanto a Beef iniciava o efeito

mais lentamente, em geral em um ponto central no centro da monocamada. Após o experimento, as cepas foram concentradas, associadas a 5% de DMSO, aliqüotadas em criotubos de 1.800 µl e congeladas gradualmente, inicialmente 24 horas em ultracongelador Revco (- 80 °C) e posteriormente transferidas para o nitrogênio líquido. A viabilidade das cepas foi comprovada quando uma aliqüota de cada cepa foi descongelada e inoculada em novas monocamadas de células VERO. Em média, os efeitos citopáticos foram observados após 17-18 dias pós-descongelamento (ANEXO II, PRANCHA V).

Outros estudos, como a padronização de testes para diagnóstico da infecção pelo protozoário (IFI, ELISA e IHQ), deverão ser realizados, na tentativa de baratear os custos de diagnóstico e disponibilizar esses testes aos produtores pecuários locais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, M.L., ANDRIANARIVO, A.G., CONRAD, P.A. Neosporosis in cattle. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 60, p.417-431, 2000.
- ANDERSON, M.L., BLANCHARD, P.C., BARR, B. C., DUBEY, J. P., HOFFMAN, R. L., CONRAD, P. A. *Neospora*-like protozoan infections as a major cause of abortion in California dairy cattle. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.198, p.241-244, 1991.
- ANDERSON, M.L., BLANCHARD, P.C., BARR, B.,C. A survey of causes of bovine abortion occurring in the San Joaquin Valley, California. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.2, p.283-287, 1990.
- ANDREOTTI, R., PINCKNEY, R., GOMES, A. Diagnóstico sorológico de *Neospora caninum* em rebanho bovino de corte de Mato Grosso do Sul. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 9, 1999, Salvador: **Anais...** Salvador, 1999. p.226.

- ANUARIO DA PECUARIA BRASILEIRA (ANUALPEC). **FNP Consultoria e Comércio**, São Paulo, Brasil. 2001. 359p.
- BARBER, J.S., GASSER, R.B., ELLIS, J., REICHEL, M.P., McMILLAN, D., TREES, A.J. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in different canid populations. **J. Parasitol.**, v.83, p. 1056-1058, 1997.
- BARBER, J.S., TREES, A.J. Clinical aspects of 27 cases of neosporosis in dogs. **Vet. Rec.**, v.139, p.439-443, 1996.
- BARR, B. C., ANDERSON, M.L., BLANCHARD, P.C., DAFT, B. M., KINDE, H., CONRAD, P. A. Bovine fetal encephalitis and miocarditis associated with protozoal infections. **Vet. Pathol.**, v.27, p.354-361, 1990.
- BARR, B.C., ANDERSON, M.L., WOODS, L.W., DUBEY, J.P., CONRAD, P.A. *Neospora*-like protozoal infections associated with abortion in goats. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.4, p.365-367, 1992.
- BARR, B.C., CONRAD, P.A, SVERLOW, K.W., TARANTAL, A.F., HENDRICKX, A.G. Experimental foetal and transplacental *Neospora* infection in the nonhuman primate. **Lab. Invest.**, v.71, p.236-242, 1994.
- BARTELS, C.J.M., WOUDA, W., SCHUKKEN, Y.H. Risk factors for *Neospora caninum* associated abortion storms in dairy herds in The Netherlands (1975-1997). **Theriogenology**, v.52, p.247-252, 1999.
- BJERKÅS, I., MOHN, S. F., PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Z. Parasitenkd.**, v.70, p.271-274, 1984.
- BJÖRKMAN, C., JOHANSSON, O., STENLUND, S. *Neospora* species infection in a herd of dairy cattle. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.208, p.1441-1444, 1996.
- BRAUTIGAN, F. E., HIETALA, S. K., GLASS, R. Resultados de levantamentos sorológicos para a espécie *Neospora* em bovinos de corte e leite. In: CONGRESSO PANAMERICANO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, 15, 1996, Campo Grande, MS. **Anais...** Campo Grande: Associação Panamericana de Ciências Veterinárias, 1996. p. 284.
- BURLESON, F.G., CHAMBERS, T.M., WIEBRAUCK, D.L. **Virology, a laboratory manual**: Section II. [S.l.: s.n.], 1992.
- BUXTON, D, MALEY, S.W., PASTORET, P.P., BROCHIER, B., INNES, A.E. Examination of red fox (*Vulpes vulpes*) from Belgium for antibody to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **Vet. Rec.**, v. 141, p.308-309, 1997.
- BUXTON, D., CALDOW, G.L., MALEY, S.W., MARKS, J. Neosporosis and bovine abortion in Scotland. **Vet. Rec.**, v. 20/27, p. 649-651, 1997.
- BUXTON, D., MALEY, S.W., WRIGHT, S., THOMSON, K., RAE, A., INNES, E.A. The pathogenesis of experimental pathogenesis neosporosis in pregnant sheep. **J. Comp. Pathol.**, v.118, p.267-279, 1998.
- CABASSO, V. J., SCHROEDER, C.R., STEBBINS, M.R. Isolation of distemper virus from the South American maned wolf (*Chrysocyon jubatus*). **Vet. Med.**, p.330-332, july, 1956.
- CASTRO, R.S., LEITE, R.C., ABREU, J.J., LAGE, A.P., FERRAZ, I.B., LOBATO, Z.I.P., BALSAMÃO, S.L.E.. Prevalence of antibodies to selected viruses in bovine embryo donors and recipients from Brazil, and its implications in international embryo trade. **Trop. Anim. Health Prod.**, v.24, n.3, p.173-6, 1992.
- CAVALIER-SMITH, T. Kingdom Protozoa and Its 18 Phyla. **Microb. Rev.**, v.57, n.4, p.953-994, 1993.

- CHEADLE, M.A., LINDSAY, D.S., BLAGBURN, B.L. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs. **Vet. Parasitol.**, v.85, n.4, p.325-330, 1999.
- CORBELLINI, L. G., DRIEMEIER, D., CRUZ, C., DIAS, M. M. Aborto bovino por *Neospora caninum* no Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, v.30, n.5, p.863-868, 2000.
- CORBELLINI, L. G., DRIEMEIER, D., MORI, A. M., TRAVERSO, S. D. Avaliação de um surto de aborto causado por *Neospora caninum* em uma propriedade leiteira no estado de Santa Catarina. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.25, n.2, p. 258-259, 2001.
- COX, B.T., REICHEL, M.P., GRIFFITHS, L.M. Serology of a *Neospora* abortion outbreak on a dairy farm in New Zealand: a case study. **New Zealand Vet. J.**, v.46, p.28-31, 1998.
- CURRENT, W.L., UPTON, S.J., LONG, P.L. Chapter 1: Taxonomy and life cycles. In: LONG, P.L. **Coccidiosis of man and domestic animals**. Boca Raton: CRC Press, 1990. p.2-16.
- DAVISON, H.C., FRENCH, N.P., TREES, A.J. Herd-specific and age-specific seroprevalence of *Neospora caninum* in 14 British dairy herds. **Vet. Rec.**, v. 144, p.547-550, 1999.
- DE MAREZ, T. LIDDEL, S., DUBEY, J.P., JENKINS, M.C., GASBARRE, L. Oral infection of calves with *Neospora caninum* oocysts from dogs: humoral and cellular immune responses. **Int. J. Parasitol.**, v.29, p.1647-4657, 1999.
- DEAN, A. G. DEAN, J. A., COULOMBIER, D., BRENDEL, K. A. **Epi Info. Version 6: a word processing database, and statistics program for epidemiology on microcomputers**. Atlanta, Georgia, USA: Centers of Disease Control and Prevention, 1994. 589p.
- DIJKSTRA, Th, EYSKER, M., SHARES, G., CONRATHS, F.J., WOUDA, W., BARKEMA, H.W. Dogs shed *Neospora caninum* oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrums spiked with *Neospora caninum* tachyzoites. **Int. J. Parasitol.**, v.31, p.747-752, 2001a.
- DIJKSTRA, Th., BARKEMA, H.W, EYSKER, M., WOUDA, W. Evidence of post-natal transmission of *Neospora caninum* in Dutch dairy herds. **Int. J. Parasitol.**, v.31, p.209-215, 2001b.
- DOBSON, H., SMITH, R.F. What is stress, and how does it affect reproduction. **Anim. Reprod. Sci.**, v.60-61, p.743-752, 2000.
- DUBEY, J. P. WAAP and Pfizer award for excellence in veterinary parasitology research pursuing life cycles and transmission of cyst-forming coccidian of animals and humans. **Vet. Parasitol.**, v. 64, p.13-20, 1996.
- DUBEY, J. P., CARPENTER, J. L., SPEER, C. A., TOPPER, M. J., UGGLA, A. Newly recognized fatal protozoan diseases of dogs. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 192, p.1269-1285, 1988a.
- DUBEY, J. P., HATTEL, A. L., LINDSAY, D. S., TOPPER, M. J. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 193, p.1259-1263, 1988b.
- DUBEY, J.P. Recent advances in *Neospora* and neosporosis. **Vet. Parasitol.**, v. 84, p.349-367, 1999.
- DUBEY, J.P., DOROUGH, K.R., JENKINS, M.C., LIDDELL, S., SPEER, C.A., KWOK, O.C.H., SHEN, S.K. Canine neosporosis: clinical signs, diagnosis, treatment and isolation of *Neospora caninum* in mice and cell culture. **Int. J. Parasitol.**, v. 28, p.1293-1304, 1998.

- DUBEY, J.P., HARTLEY, W.J., LINDSAY, D.S., TOPPER, M.J., Fatal congenital *Neospora caninum* infection in a lamb. **J. Parasitol.**, v. 76, p.127-130, 1990.
- DUBEY, J.P., LINDSAY, D.S. A review of *Neospora* and neosporosis. **Vet. Parasitol.**, v. 67, p.1-59, 1996.
- DUBEY, J.P., LINDSAY, D.S. Transplacental *Neospora caninum* infection in dogs. **Am. J. Vet. Res.**, v. 50, p.1578-1579, 1989.
- DUBEY, J.P., METZGER, F.L., HATTEL, A.L., LINDSAY, D.S., FRITZ, D.L. Canine cutaneous neosporosis: Clinical Improvement with Clindamycin. **Vet. Dermatol.**, v. 6, n.1, p.37-43, 1995.
- DUBEY, J.P., MORALES, J.A., VILLALOBOS, P., LINDSAY, D.S., BLAGBURN, B.L., TOPPER, M.J. Neosporosis-associated abortion in a dairy goat. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 280, p.263-265, 1996.
- DUBEY, J.P., PORTERFIELD, M.L. *Neospora caninum* (Apicomplexa) in an aborted equine foetus. **J. Parasitol.**, v. 76, p.732-734, 1990.
- DYER, R.M., JENKINS, M.C., KWOK, O.C.H., DOUGLAS, L.W., DUBEY, J.P. Serologic survey of *Neospora caninum* infection in a closed dairy cattle herd in Maryland: risk of serologic reactivity by production groups. **Vet. Parasitol.**, v. 90, p. 171-181, 2000.
- FUJII, T.U., KASAI, N., NISHI, S.M., DUBEY, J.P., GENNARI, S.M. Seroprevalence of *Neospora caninum* in female water buffaloes (*Bubbalus bubalis*) from the southeastern region of Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 99, p.331-334, 2001.
- GIBBS, E.P.J., RWEYEMAMU, M.M. Bovine herpes-viruses 1. Part I – Bovine herpesvirus 1. **Vet. Bull.**, v.47, n.5, p.317-343, 1977.
- GONDIM, L. F. P., PINHEIRO, A. M., SANTOS, P. O. M., JESUS, E. E. V. RIBEIRO, M. B. FERNANDEZ, H. S., ALMEIDA, M. A. O., FREIRE, S. M., MEYER, R. McALLISTER, M. M. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected dog, and production of encysted bradyzoites in gerbils. **Vet. Parasitol.**, v. 101, p.1-7, 2001.
- GONDIM, L. F. P., SARTOR, I. F. Detecção de anticorpos contra *Neospora caninum* em vacas leiteiras em uma propriedade com histórico de aborto. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 10, 1997, Itapema, SC. **Anais...Itapema: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 1997.** p.346.
- GONDIM, L. F. P., SARTOR, I. F., HASEGAWA, M., YAMANE, I. Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in Bahia, Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 86, p.71-75, 1999.
- GONDIM, L. F. P., SARTOR, I. F., MONTEIRO JUNIOR, L. A., HARITANI, M. *Neospora caninum* infection in an aborted bovine foetus in Brazil. **New Zealand Vet. J.**, v.47, n.35, p.35, 1999c.
- GONDIM, L. F. P., SOUZA, R. M., GUIMARÃES, J. E., ALMEIDA, M. A. O. Frequência de anticorpos contra *Neospora caninum* em búfalos criados no estado da Bahia. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 9, 1999, Salvador: **Anais...** Salvador, 1999b. p.227.
- GONDIM, L.F.P., SAEKI, H., ONAGA, H., HARITANI, M., YAMANE, I. Maintenance of *Neospora caninum* tachyzoites using Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). **New Zealand Vet. J.**, v. 47, p.36, 1999a.
- GRAHAM, D. A., CALVERT, V., WHYTE, M., MARKS, J. Absence of serological evidence for human *Neospora caninum* infection. **Vet. Rec.**, v. 144, 672-673, 1999.

- GUARINO, A., FUSCO, G., SAVINI, G., DI FRANCESCO, G., CRINGOLI, G. Neosporosis in water buffalo (*Bubbalus bubalis*) in southern Italy. **Vet. Parasitol.**, v. 91, p.15-21, 2000.
- GUY, J.S., POTGIETER, L.N.D. Kinetics of antibody formation after the reactivation of bovine herpes-virus 1 infection in cattle. **Am. J. Vet. Res.**, v.46, n.4, 1985.
- HAMIR, A.N., TORNQUIST, S.J., GERROS, T.C., TOPPER, M.J., DUBEY, J.P. *Neospora caninum* associated equine protozoal myeloencephalitis. **Vet. Parasitol.**, v. 79, 269-274, 1998.
- HIETALA, S.K., THURMOND, M.C. Postnatal *Neospora caninum* transmission and transient serologic responses in two dairies. **Int. J. Parasitol.**, v.29, p.1669-1676, 1999.
- HILALI, M., ROMAND, S., THULLIEZ, P., KWOK, O.C.H., DUBEY, J.P. Prevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* antibodies in sera from camels in Egypt. **Vet. Parasitol.**, v. 75, 269-271, 1998.
- INNES, E. A., WRIGHT, S.E., MALEY, S., RAE, A., SCHOCK, A., KIRVAR, E., BARTLEY, P., HAMILTON, C., CAREY, I.M., BUXTON, D. Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. **Int. J. Parasitol.**, v.31, p.1523-1534, 2001.
- JENSEN, L., JENSEN, T.K., LIND, P., HENRIKSEN, S.A., UGGLA, A., BILLE-HANSEN, V. Experimental porcine neosporosis. **Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.**, v. 106, p. 475-482, 1998.
- KASARI, T. R., BARLING, K., McGRANN, J. M. Estimated production and economic losses from *Neospora caninum* infection in Texas beef herds. **Bov. Pract.**, v. 33, n.2, p.113-120, 1999.
- KISH & LESLIE. **Survey sampling**. New York: John Wiley & Sons, 1965.
- LINDBERG, A., ALENIUS, S., NORDMARK, P., PETERSSON, K. Identifying dams carrying persistently infected fetuses – a critical measure in livestock trade and a tool in delimiting outbreaks in larger and/or recently infected herds. In: EUR. SYMP. ON CONTROL OF BVD-VIRUS INFECTION IN CATTLE. **Proceedings...** Lillehammer, Norway, 1997. p.51.
- LINDSAY, D. S., DUBEY, J. P. Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. **Am. J. Vet. Res.**, v. 50, p.1981-1983, 1989.
- LINDSAY, D.S., DUBEY, J.P. *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa) infections in rats. **Can. J. Zoology.**, v. 68, p.1595-1599, 1990b.
- LINDSAY, D.S., DUBEY, J.P. Infections in mice with tachyzoites and bradyzoites of *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa). **J. Parasitol.**, v. 76, p.410-413, 1990a.
- LINDSAY, D.S., DUBEY, J.P., DUNCAN, R.B. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. **Vet. Parasitol.**, v. 82, n. 4, p.327-333, 1999.
- LINDSAY, D.S., KELLY, E.J., MCKOWN, R. et al. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in coyotes (*Canis latrans*) and experimental infections of coyotes with *Neospora caninum*. **J. Parasitol.**, v.82, p.657-659, 1996.
- LINDSAY, D.S., UPTON, S.J., DUBEY, J.P. A structural study of the *Neospora caninum* oocyst. **Int. J. Parasitol.**, v.29, p.1521-1523, 1999b.
- LINDSAY, D.S., WESTON, J.L., LITTLE, S.E. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in gray foxes (*Urocyon cinereoargenteus*) from South Carolina. **Vet. Parasitol.**, v. 97, p.159-164, 2001.

- MAIA, O.B, GOUVEIA, A.M.G., SOUZA, A.M., BARBOSA, E.F. Avaliação pós-vacinal de lobos guarás (*Chrysocyon brachyurus*) (Illiger, 1811) contra os vírus da cinomose e parvovirose caninas. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.51, n.5, p.415-420, 1999.
- MAINAR-JAIME, R.C., THURMOND, M.C., BERZAL-HERRANZ, B., HIETALA, S.K. Seroprevalence of *Neospora caninum* and abortion in dairy cows in northern Spain. **Vet. Rec.**, v.145, p.72-75, 1999.
- MARSH, A.E., BARR, B.C., MADIGAN, J.E., CONRAD, P.A. In vitro cultivation and characterization of a *Neospora* isolate obtained from a horse with protozoal myoencephalitis. In: AM. SOC. PARASITOL. AND THE SOCIETY OF PROTOZOOLOGISTS. Tucson, Arizona. **Abstract**, n. 114, 11-15, june, 1996.
- MARSH, A.E., BARR, B.C., PACKHAM, A.E., CONRAD, P.A. Description of a new *Neospora* species (Protozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae). **J. Parasitol.**, v. 84, p.983-91, 1998.
- McALLISTER, M.M., BJORKMAN, C., ANDERSON-SPRECHER, R., ROGERS, D.G. Evidence of point-source exposure to *Neospora caninum* and protective immunity in a herd of beef cows. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 15, 2000.
- McALLISTER, M.M., DUBEY, J.P., LINDSAY, D.S., JOLLEY, W.R., WILLS, R.A., MCGUIRE, A.M. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **Int. J. Parasitol.**, v. 28, p.1473-1478, 1998a.
- McALLISTER, M.M., JOLLEY, W.R., WILLS, LINDSAY, D.S., R.A., MCGUIRE, A.M., TRANAS, J.D. Oral inoculation of cats with tissue cysts of *Neospora caninum*. **Am. J. Vet. Med. Res.**, v. 59, p. 441-444, 1998b.
- McALLISTER, M.M., MCGUIRE, A.M., JOLLEY, W.R., LINDSAY, D.S., TREES, A.J., STOBART, R.H. Experimental neosporosis in pregnant ewes and their offspring. **Vet. Pathol.**, v. 33, p. 647-655, 1996.
- McALLISTER, M.M., WALLACE, D. Reduce yours herd's risk of *Neospora* abortions. The keys are controlling dogs and protecting your feed supplies. **H. Dairy.**, p.438, june, 1999.
- McALLISTER, M.M., WILLS, R.A., MCGUIRE, A.M., JOLLEY, W.R., TRANAS, J.D., WILLIAMS, E.S., LINDSAY, D.S., BJÖRKMAN, C., LEE BELDEN, E. Ingestion of *Neospora caninum* tissue cysts by *Mustela* specie. **Int. J. Parasitol.**, v. 29, p.1531-1536, 1999.
- MCGUIRE, A.M., McALLISTER, M.M., WILLS, R.A., TRANAS, J.D. Experimental inoculation of dometic pigeons (*Columbia livia*) and zebra finches (*Poephila guttata*) with *Neospora caninum* tachyzoites. **Int. J. Parasitol.**, v. 29, p.1525-1529, 1999.
- MELO, C.B. **Distribuição de anticorpos neutralizantes contra o herpes-vírus bovino 1 (HVB 1) em rebanhos bovinos de aptidão leiteira e de corte do Estado de Minas Gerais.** Belo Horizonte: UFMG, Escola de Veterinária, 1998. 82 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária).
- MELO, C.B., LEITE, R.C. *Neospora caninum* em Minas Gerais: dados preliminares. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 9, 1999, Salvador: **Anais...** Salvador, 1999. p.225-226.
- MELO, C.B., LEITE, R.C., COUTO, I.P., LEITE, R.C. *Neospora caninum*: distribuição de anticorpos em três faixas etárias de rebanhos bovinos de leite em Minas Gerais. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.25, n.2, p.250-252, 2001.

- MICKELSEN, W.D., EVERMANN, J.F. In utero infections responsible for abortions, stillbirth and birth of weak calves in beef cows. **Vet. Clin. N. Am.: F. Anim. Pract.**, v. 10, n.1, p.1-13, 1994.
- MINEO, T.W.P., SILVA, D.A.O., COSTA, G.H.N., VON ANCKEN, A.C.B., KASPER, L.H., SOUZA, M.A., CABRAL, D.D., COSTA, A.J., MINEO, J.R. Detection of IgG antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs examined in a veterinary hospital from Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 98, p.239-245, 2001.
- MOENNING, V., LIESS, B. Pathogenesis of intrauterine infections with bovine viral diarrhea virus. **Vet. Clin. N. Am.: F. Anim. Pract.**, v. 11, n.3, p.477-487, 1995.
- NETTLETON, P.F., ENTRICAN, G. Ruminant pestiviruses. **Br. Vet. J.**, v. 151, p.615-642, 1995.
- OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (O.I.E.). **Manual of standards for diagnostic tests and vaccines**. 2. ed. Paris, France: [s.n.], 1992, 783p.
- OGAWA, L., NAVARRO, I. T., VIDOTO, O., FREIRE, R. L. Avaliação sorológica do *Neospora caninum* e *T. gondii* em bovinos de leite da região norte do Paraná. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 9, 1999, Salvador: **Anais...** Salvador, 1999. p. 225.
- OKUDA, L. H., PITUCO, E. M., STEFANO, E., PERUCINI, L. M. Isolamento de *Neospora caninum* em amostras de fetos bovinos abortados no Brasil. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.25, n.2, p. 248-250, 2001.
- OOI, H.K., HUANG, C-C, YANG, C-H., LEE, S-H. Serological survey and first finding *Neospora caninum* in Taiwan, and the detection of its antibodies in various body fluids of cattle. **Vet. Parasitol.**, v. 90, p.47-55, 2000.
- OTTER, A., WILSON, B. W. Bovine abortion outbreaks associated with *Neospora* and other infectious agents. **Vet. Rec.**, v. 20/27, p.659-660, 1997.
- PARÉ, J. THURMOND, M. C., HIETALA, S. K. Congenital *N. caninum* infection in dairy cattle and associated calthood mortality. **Can. J. Vet. Res.**, v. 60, p.133-139, 1996.
- PARÉ, J., FECTEAU, G., FORTIN, M., MARSOLAIS, G. Seroepidemiologic study of *Neospora caninum* in dairy herds. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.213, n.11, p.1595-1598, 1998.
- PARÉ, J., HIETALA, S.K., THURMOND, M.C. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for serological diagnosis of *Neospora sp.* infection in cattle. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 7, 352-359, 1995a.
- PARÉ, J., HIETALA, S.K., THURMOND, M.C. Interpretation of an indirect fluorescent antibody test for diagnosis of *Neospora sp.* infection in cattle. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 7, p.273-275, 1995.
- PETERS, M, LÜTKEFELS, E., HECKEROTH, A.R., SCHARES, G. Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle. **Int. J. Parasitol.**, v.31, p.1144-1148, 2001a.
- PETERS, M, WOHLSEIN, P, KNIERIEM, A., SCHARES, G. *Neospora caninum* infection associated with stillbirths in captive antelopes (*Tragelaphus imberbis*). **Vet. Parasitol.**,v. 97, p.153-157, 2001.
- PETERSEM, E., LEBECH, M., JENSEN, L., LIND, P., RASK, M., BAGGER, P., BJÖRKMAN, C., UGGLA, A. *Neospora caninum* infection and repeated abortions in humans. **Emerging Infectious disease**, 1999. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol5no2/petersem.htm>

- PFEIFFER, D.U., WILLIANSO, N.B., THORNTON, R.N. A simple spreadsheet simulation model of the economics effects of *Neospora caninum* abortions in dairy cattle in New Zealand. In: Symposium of the International Society for Veterinary Epidemiology and Economics, 8, July 8-11, 1997. Paris, France. **Proceedings...** Paris, 1977. (Special Issue of *Epidemiologie et santé animale*. 31-32, 10.12-3).
- PITUCO, E. M., SOARES, J. A. G., OKUDA, L. H., STEFANO, E. Ocorrência de neosporose bovina em rebanhos com histórico de abortamento no Brasil. In: REUNIÃO ANUAL DO INSTITUTO BIOLÓGICO, 11, 1998, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Instituto Biológico, 1998. p.70.
- REICHEL, M.P. Prevalence of *Neospora* antibodies in New Zealand dairy cattle and dogs. **New Zealand Vet. J.**, v. 46, p.38, 1998.
- SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221p.
- SANDERSON, M.W., GAY, J.M., BAZLER, T.V. *Neospora caninum* seroprevalence and associated risk factors in beef cattle in the northwestern United States. **Vet. Parasitol.**, v. 90, p. 15-24, 2000.
- SANTOS, P.O.M., VIANA de JESUS, E.E., PINHEIRO, A.M., ALMEIDA, M.A.O., GUIMARÃES, J.E., SOUZA, R.M., GONDIM, L.F.P. Frequência de anticorpos contra *Neospora caninum* em cães criados no estado da Bahia. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 9, 1999, Salvador. **Anais...** Salvador, 1999. p.228.
- SARTOR, I. F., HASEGAWA, M. Y., GONDIM, L. F. P., PIAGENTINI, M., VIEIRA, A., MEGID, J., CANAVESSI, A. M. Prevalência de anticorpos contra *Neospora caninum* em rebanhos leiteiros do município de Avaré, SP. Resultados preliminares. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 9, 1999, Salvador. **Anais...** Salvador, 1999. p.225.
- SAWADA, M., PARK, C.H., KONDO, H., MORITA, T., SHIMADA, A., YAMANE, I., UMEMURA, T. Serological survey of antibody to *Neospora caninum* in Japanese dogs. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 60, p. 853-854, 1998.
- SCHARES, G., PETERS, M., WURM, R., BÄRWALD, A., CONRATHS, F.J. The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analysed by serological techniques. **Vet. Parasitol.**, v. 80, p. 87-98, 1998.
- SIMPSON, V.R., MONIES, R.J., RILEY, P., CROMEY, D.S. Foxes and neosporosis. **Vet. Rec.**, v. 141, p.503, 1997.
- SPEER, C.A., DUBEY, J.P., McALLISTER, M.M., BLIXT, J.A. Comparative ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites, and tissue cysts of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **Int. J. Parasitol.**, v. 29, p. 1509-1519, 1999.
- STENLUND, S., KINDAHL, H., MAGNUSSON, U., UGGLA, A., BJÖRKMAN, C. Serum antibody profile and reproductive performance during two consecutive pregnancies of cows naturally infected with *Neospora caninum*. **Vet. Parasitol.**, v. 85, p. 227-234, 1999.

- STÖBBE, N. S., CORTES, J. A. Estudo interativo entre a presença de anticorpos anti *Neospora caninum* e a ocorrência de abortamentos em bovinos no noroeste do estado de São Paulo, Brasil. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 9, 1999, Salvador. **Anais...** Salvador, 1999, p.226.
- SUTEERAPARP, P., PHOLPARK, S., PHOLPARK, M., CHAROENCHAI, A., CHOMPOOCHAN, T., YAMANE, I., KASHIWAZAKI, Y. Seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* and associated abortion in dairy cattle from central Thailand. **Vet. Parasitol.**, v. 86, p. 49-57, 1999.
- THILSTED, J.P., DUBEY, J.P. Neosporosis-like abortion in a herd of dairy cattle. **J. Vet. Diag. Invest.**, v.1, p.205-209, 1989.
- THRUSFIELD, M. **Veterinary epidemiology**. London: Butterworths, 1986. cap.14, 339p.
- THURMOND, M.C., HIETALA, S.K. Culling associated with *Neospora caninum* infection in dairy cows. **American Journal of Veterinary Research**, v.57, n.11, p.1559-1561, 1996.
- THURMOND, M.C., HIETALA, S.K. Effect of *Neospora caninum* infection in first-lactation dairy cows. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.210, n. 5, p.672-674, 1997.
- THURMOND, M.C., HIETALA, S.K., BLANCHARD, C. P., Herd-based diagnosis of *N. caninum*-induced endemic and epidemic abortion in cows and evidence for congenital and postnatal transmission. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 9, p.44-49, 1997.
- WALDNER, C.L., JANZEN, E.D., RIBBLE, C.S. Determination of the association between *Neospora caninum* infection and reproductive performance in beef herds. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 213, p.685-690, 1998.
- WENTINCK, G.H., van OIRSCHOT, J.T., VERHOEFF, J. Risk of infection with bovine herpes-virus 1 (BHV 1): a review. **Vet. Q.**, v.15, p.30-33, 1993.
- WILLIAMS, D.J.L., GUY, F., MCGARRY, J., GUY, F., TASKER, L., SMITH, R., MACEACHERN, K., CRIPPS, P., KELLY, D., TREES, A.J. *N. caninum* associated abortion in cattle: the time of experimental-induced parasitaemia during gestation determines foetal survival. **Parasitol.**, v. 121, p.347-358, 2000.
- WOODS, L.W., ANDERSON, M.L., SWIEF, P.K. SVERLOW, K.W. Sistemic neosporosis in a California black-tailed deer (*Odocoileus hemionus columbianus*). **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 6, p.508-510, 1994.
- WOUDA, W., BARTELS, C.J.M., MOEN, A.R. Characteristics of *Neospora caninum*-associated abortion storms dairy herds in The Netherlands (1995 to 1997). **Theriogenology**, v. 52, p. 233-245, 1999a.
- WOUDA, W., BRINKHOF, J.M.A, van MAANEN, C., DE GEE, A.L.W., MOEN, A.R., Serodiagnosis of neosporosis in individual cows and dairy herds, a comparative study of three enzyme-linked immunosorbent assays. **Clinic. Diagn. Lab. Immun.**, v.5, p.711-716, 1998.
- WOUDA, W., DIJKSTRA, Th., KRAMER, A.M.H., VAN MAANEN, C., BRINKHOF, J.M.A. Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infections in dogs and cattle. **Int. J. Parasitol.**, v. 29, p.1677-1682, 1999b.
- WOUDA, W., MOEN, A.R, VISSER, I. J. R., van KNAPEN, F. Bovine fetal neosporosis: a comparison of epizootic and esporadic abortion cases and different age classes with regard to lesion severity and imunohistochemical identification of organisms in brain, heart and liver. **J. Vet. Diagn. Invest**, v. 9, p180-185, 1997.

ANEXOS

ANEXO I

RESUMOS RELACIONADOS A *Neospora caninum* PUBLICADOS EM CONGRESSOS
(1999 – 2001)

- 1) MELO, C.B., LEITE, R.C. *Neospora caninum* em Minas Gerais: dados preliminares In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 9, 1999, Salvador: Anais... Bahia, 1999. p.225-226. Resumo.
- 2) MELO, C.B., LEITE, R.C., COUTO, I.P., MORO, E., LEITE, R.C. Frequência de anticorpos contra o *Neospora caninum* em rebanhos bovinos de leites A, B e C de Minas Gerais. CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIA, 27, 2000, Águas de Lindóia. Anais... São Paulo: 2000. p-228. Resumo.
- 3) MELO, C.B., LEITE, R.C., COUTO, I.P., BRESCIA, E.M., MAIA, O.B., LEITE, R.C. Situação sorológica de alguns carnívoros da fauna brasileira para *Neospora caninum*. CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA, 4, 2001, Campo Grande. Anais... Mato Grosso do Sul: 2001. Trabalho 108. Resumo.
- 4) MELO, C.B., LEITE, R.C., SANT'ANA, F.J.F., COUTO, I.P., BRESCIA, E.M., PAZ, G.F., LEITE, R.C. Manutenção *in vivo* de taquizoítos de *Neospora caninum*. CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA, 4, 2001, Campo Grande. Anais... Mato Grosso do Sul: 2001. Trabalho 107. Resumo.
- 5) MELO, C.B., LEITE, R.C., SANT'ANA, F.J.F., BRESCIA, E.M., COUTO, I.P., LEITE, R.C. Alterações clínicas e anatomopatológicas em "Mongolian Gerbils" (*Meriones unguiculatus*) infectados experimentalmente por *Neospora caninum*. CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA, 4, 2001, Campo Grande. Anais... Mato Grosso do Sul: 2001. Trabalho 105. Resumo.
- 6) MELO, C.B., LEITE, R.C., COUTO, I.P., BRESCIA, E.M., PAZ, G.F., SANT'ANA, F.J.F., LEITE, R.C. Infecção de cães com amostras de tecido nervoso de vacas naturalmente soropositivas para *Neospora caninum*. CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA, 4, 2001, Campo Grande. Anais... Mato Grosso do Sul: 2001. Trabalho 109. Resumo.
- 7) LEITE, R.C. & MELO, C.B. Variação na taxa de soropositividade para *Neospora Caninum* em vacas leiteiras, de acordo com o grau de tecnificação das fazendas, no estado de Minas Gerais, Brasil. CONGRESSO IBÉRICO DE PARASITOLOGIA, 7, 2001, Porto. Anais... Portugal: 2001. Trabalho 81, EP – 217. Resumo.
- 8) LEITE, R.C. & MELO, C.B. Prevalência de anticorpos para *Neospora caninum* em vacas vacinadas contra agentes abortivos virais, em três fazendas do estado de Minas Gerais, Brasil. CONGRESSO IBÉRICO DE PARASITOLOGIA, 7, 2001, Porto. Anais... Portugal: 2001. Trabalho 82, EP – 218. Resumo.
- 9) LEITE, R.C. & MELO, C.B. Ocorrência de soropositividade para *Neospora caninum* em vacas leiteiras, de acordo com o grau de tecnificação das fazendas, no estado de Minas Gerais, Brasil. CONGRESSO IBÉRICO DE PARASITOLOGIA, 7, 2001, Porto. Anais... Portugal: 2001. Trabalho 83, EP – 219. Resumo.
- 10) PAZ, G.F., LEITE, R.C., MELO, C.B., LEITE, R.C. Manutenção e estudo de cepas de *Neospora caninum* em cultivo celular. Encontro de Pesquisa da UFMG, 2001 (submetido).

1) *Neospora caninum* EM MINAS GERAIS: DADOS PRELIMINARES*

Neospora caninum (Protozoa: Apicomplexa) é um protozoário do cão que infecta os bovinos, embora ocorra em outras espécies domésticas e selvagens. Aos cães têm sido atribuídos problemas neurológicos, e nos bovinos infectados têm sido observados abortamento nas várias fases da gestação, problemas neurológicos nos bezerros e defeitos teratogênicos nos fetos. O cão é o hospedeiro definitivo, o qual, provavelmente, transmite a infecção aos bovinos pela contaminação de pastos, comedouros e bebedouros por oocistos nas fezes. *Neospora caninum* (NC) tem sido implicado como a principal causa de abortamento em vacas leiteiras nos Estados Unidos, onde a prevalência sorológica é alta. No Brasil, alguns diagnósticos sorológicos têm sido feitos, e em Minas Gerais nada ainda foi relatado, embora o índice de abortamento sem diagnóstico seja grande.

Em três rebanhos de bovinos leiteiros, localizados na região metropolitana de Belo Horizonte, onde os casos de abortamento eram frequentes e não foram achados outros agentes etiológicos, foram testados 39 soros sanguíneos de vacas e de sete cães das propriedades amostradas, em um "kit" ELISA comercial (IDEXX, Inc., Herdcheck[®]), para *N. caninum*. Com relação a esses animais, todas as vacas do primeiro rebanho (18) e todos os cães foram soronegativos para *N. caninum*. No segundo rebanho, uma novilha, entre seis pesquisadas, reagiu positivamente, ao passo que no terceiro rebanho duas vacas, entre 15, foram soropositivas. Apesar desses resultados, não foram feitos outros estudos, como sorologia dos fetos e histopatologia, não se podendo, assim, afirmar que os abortamentos foram causados por *N. caninum*. Portanto, mais estudos devem ser conduzidos com o intuito de esclarecer a importância de *N. caninum* nos rebanhos bovinos em Minas Gerais.

* Ver ANEXO II – PRANCHA I.

2) FREQUÊNCIA DE ANTICORPOS CONTRA *Neospora caninum* EM REBANHOS BOVINOS LEITEIROS A, B E C EM MINAS GERAIS

Neospora caninum (Protozoa, Apicomplexa) é um parasito recentemente descrito que tem o cão como hospedeiro definitivo e o bovino como um dos seus hospedeiros intermediários. Neste último, pode causar abortamentos, natimortos, prematuros e bezerros com problemas teratogênicos. Tem sido descrito mundialmente com grande impacto econômico. Entretanto, em Minas Gerais, apesar de anticorpos contra *N. caninum* já terem sido relatados em bovinos, a sua frequência nunca foi estudada de forma mais abrangente.

Com o objetivo de averiguar a frequência de anticorpos contra *N. caninum* em bovinos leiteiros, foram testadas 359 amostras de soros de fêmeas, coletadas entre fevereiro e junho de 1997, de acordo com três diferentes faixas etárias (faixa I – de 7 a 18 meses de idade; de 18 a 30 meses e animais com idade superior ou igual a 31 meses, respectivamente, para as faixas etárias II e III), sendo 80 amostras da faixa etária I, 81 da faixa etária II e 198 da faixa etária III. Os animais pertenciam a 10 rebanhos localizados em oito municípios mineiros (Barbacena, Ouro Preto, Itabirito, Caeté, Pedro Leopoldo, Betim, Igarapé e Cordisburgo). Foi coletado sangue de um mínimo de 15% do rebanho em cada faixa etária amostrada, sendo utilizado para os exames um teste ELISA indireto comercial (HerdChek, IDEXX Laboratories, Inc.).

Do total de amostras testadas, 72 (20,05%) foram positivas, sendo 16 amostras pertencentes à faixa etária I (20%), 19 à faixa etária II (23,45%) e 37 à faixa etária III (18,68%). Em todos os rebanhos e em todos os municípios foram encontrados animais soropositivos para *N. caninum*, bem como em todos os rebanhos havia histórico de problemas reprodutivos, principalmente abortamentos.

Ficou evidenciada a ampla exposição dos bovinos leiteiros nas regiões estudadas, principalmente na faixa etária II, época em que se iniciam as parições. As bezerras (menores de sete meses) não foram testadas, com o intuito de eliminar a possibilidade de interferência de anticorpos colostrais.

A importância econômica desses dados ainda é incerta, mas indica que estudos com o intuito de avaliar o impacto desse agente nos índices reprodutivos dos rebanhos leiteiros em Minas Gerais devem ser priorizados, bem como aqueles estudos que visem facilitar o acesso aos meios de diagnóstico da neosporose nos nossos rebanhos.

Apoio financeiro: CNPq, FEP-MVZ e Pfizer.

3) SITUAÇÃO SOROLÓGICA DE ALGUNS CARNÍVOROS DA FAUNA BRASILEIRA PARA *Neospora caninum**

Neospora caninum (Protozoa-Apicomplexa) é implicado como uma das principais causas de abortamento em bovinos em várias regiões do mundo. Em 1998, o cão foi reconhecido como o hospedeiro definitivo desse parasito, e desde então outros, principalmente canídeos, têm sido estudados com o objetivo de confirmar a possibilidade de também serem considerados como tal.

Foi realizado um levantamento sorológico em 48 amostras de lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) e em duas amostras de cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*). As amostras dos lobos foram coletadas ao longo de 1997, sendo nove da reserva ecológica de Araxá (MG), 13 do zoológico de Belo Horizonte, oito do zôo de Brasília, oito do zôo de Curitiba, duas do zôo do Rio de Janeiro, quatro de animais capturados no interior de Minas Gerais, duas do zôo de Uberlândia (MG) e duas de um parque ecológico em Andradas (MG). As amostras dos cachorros-do-mato foram coletadas na sede do IBAMA em Belo Horizonte, em novembro de 2000, e os animais tinham sido capturados na natureza recentemente.

Para realização dos testes, foi utilizado um teste de imunofluorescência indireta (IFI) com controles positivo e negativo de cão e conjugado fluoresceína anticão (VMRD, Pullman-USA). Em nenhuma das amostras foram detectados anticorpos para o parasito. Entretanto, algumas questões podem ser discutidas. Primeiro, se realmente as espécies estudadas, por sua biologia e hábitos, podem participar do universo do parasito, principalmente quanto às suas potencialidades em exercer o carnivorismo e ter alguma importância epidemiológica no ciclo do *Neospora*. Uma segunda consideração deve ser feita quanto à plenitude do teste utilizado, já que foi empregado um conjugado anticão. Em terceiro lugar, há dificuldade na obtenção de conjugados para as espécies estudadas, principalmente por serem espécies ameaçadas de extinção e protegidas, o que dificulta a utilização de indivíduos para a produção dos reagentes específicos.

Apoio: FEP – MVZ, CNPq e IBAMA. * Ver ANEXO II – PRANCHA II.

4) MANUTENÇÃO *in vivo* DE TAQUIZOÍTOS DE *Neospora caninum**

Neospora caninum (Protozoa-Apicomplexa) é um parasito recentemente descrito que tem sido responsabilizado por grandes prejuízos para a bovinocultura, expressos na forma de abortamentos, teratogenia, repetição de cio e baixa produtividade. O diagnóstico tem sido feito pela associação de métodos sorológicos, histopatológicos e imuno-histoquímicos e pelo isolamento das formas do parasito.

Para manutenção de taquizoítos do parasito em laboratório, como nem todas as instituições possuem infra-estrutura de cultivo celular, a manutenção *in vivo* pode ser uma alternativa, principalmente quando se objetiva a implantação de testes diagnósticos.

Taquizoítos do parasito foram adquiridos (cepa Illinois - Milton McAllister, Universidade de Illinois, USA) e mantidos *in vitro* em cultivo celular. Para testar a sua viabilidade *in vivo*, foram feitas quatro passagens em "Mongolian Gerbils" (*Meriones unguiculatus*), com três animais inoculados por passagem, mantendo-se um, como controle, por passagem.

Para a primeira passagem, 6 ml de uma suspensão de taquizoítos mantidos em células de rim de macaco (VERO) foram coletados, assepticamente, de um frasco de cultura; 2 ml foram inoculados intraperitonealmente (IP) em cada animal-teste, mantendo-se como controle mais um animal, que foi inoculado com a mesma quantidade de PBS estéril. A partir da segunda passagem, foi realizada a lavagem peritoneal com 6 ml de PBS estéril, inoculados IP, em um dos animais infectados, no sexto dia de infecção, quando, posteriormente, cerca da mesma quantidade de um fluido amarelado (exsudato) foi aspirada, bem como foram reinoculados 2 ml em cada um de mais três animais. Posteriormente, foram analisadas as lesões histopatológicas causadas pelo parasito nos roedores.

Os animais inoculados apresentaram, após três dias, quadro típico de neosporose, como dispnéia intensa, anorexia, eriçamento dos pêlos e emagrecimento acentuado. Por fim, o óbito decorreu após seis a sete dias pós-inoculação, na maioria dos inoculados. Entretanto, alguns animais não morreram, mas permaneceram com lesões neurológicas. Foram observadas alterações microscópicas significativas no fígado, no pulmão, nos rins e no cérebro. Os animais-controles se mostraram clinicamente inalterados durante todas as passagens. Portanto, os animais se apresentaram altamente suscetíveis à cepa testada, podendo ser utilizados na manutenção do parasito *in vivo*.

Apoio: FEP- MVZ e CNPq. * Ver ANEXO II – PRANCHA III.

5) ALTERAÇÕES CLÍNICAS E ANATOMOPATOLÓGICAS EM "MONGOLIAN GERBILS" (*Meriones unguiculatus*) INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE POR *Neospora caninum**

Desde 1984, a comunidade científica mundial vem se dedicando a *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa), responsável por perdas econômicas em várias regiões do mundo. Em bovinos adultos, como conseqüências da infecção, são relatados abortamentos, repetição de cio e, em bezerros, teratogenia e problemas neurológicos.

Com o objetivo de verificar as conseqüências e a viabilidade da infecção por *N. caninum* em "Mongolian Gerbils" (*Meryones unguiculatus*), taquizoítos do parasito (cepa Illinois, Milton McAllister – University of Illinois, USA) mantidos em cultivo de células de rim de macaco (VERO) foram inoculados, intraperitonealmente (IP), em três animais, sendo um controle, que foi inoculado pela mesma via, com solução salina estéril.

Após três a quatro dias, os animais inoculados com a cepa demonstraram sintomatologia clínica da infecção, como emagrecimento intenso, anorexia, eriçamento dos pêlos do corpo, dispnéia intensa, alterações de comportamento (aglutinação dos animais infectados em um canto do recinto) e alterações neurológicas, como a falta de propriocepção, dismetria e paralisia flácida dos membros posteriores. Um dos animais inoculados recuperou-se dos demais sintomas, mas se manteve paraplégico e sobreviveu por mais 14 dias, quando foi sacrificado e teve suas lesões descritas. Os outros dois animais inoculados vieram a óbito após seis e sete dias, respectivamente. O animal-controle permaneceu inalterado. À necropsia, não foram encontradas alterações significativas nos animais infectados e controles. Fragmentos de pulmão, fígado, cérebro, rins e coração foram fixados em formalina neutra e tamponada a 10%, processados pela técnica rotineira de inclusão em parafina e corados por hematoxilina-eosina (HE).

Microscopicamente, foram observados no fígado focos de infiltrado inflamatório mononuclear periportal discreto e áreas multifocais de necrose envoltas por infiltrado de linfócitos, neutrófilos e macrófagos. No pulmão, observou-se pneumonia intersticial difusa caracterizada por espessamento acentuado dos septos interalveolares, congestão e edema, além de áreas focais de enfisema. O coração apresentou extensas áreas de hemorragia no miocárdio, associadas à dilatação vascular e à área de necrose envolta por infiltrado mononuclear focal. Evidenciou-se congestão discreta a moderada do parênquima renal, e alguns glomérulos continham infiltrado linfocítico discreto. Além disso, notou-se congestão discreta do parênquima cerebral e da leptomeninge.

Apoio: FEP – MVZ e CNPq. *Ver ANEXO II – PRANCHA III.

6) INFECÇÃO DE CÃES COM AMOSTRAS DE TECIDO NERVOSO DE VACAS NATURALMENTE SOROPOSITIVAS PARA *Neospora caninum**

Neospora caninum (Protozoa, Apicomplexa), importante agente abortivo para bovinos em várias partes do mundo, apesar de estar sendo exaustivamente estudado, ainda não tem seu ciclo completamente descrito. Formas como taquizoítos, cisto tecidual e bradizoítos, além dos oocistos presentes em fezes de cães, já foram descritas. Entretanto, estes últimos, encontrados experimentalmente em 1998 e confirmados posteriormente em 1999 a partir da infecção de cães com camundongos infectados artificialmente, vieram a confirmar o cão como hospedeiro definitivo do parasito. Entretanto, ainda não foram descritos ensaios com animais infectados com tecidos de animais naturalmente soropositivos, com o objetivo de confirmar se outros tipos de infecção realmente podem ter expressão epidemiológica na cadeia de perpetuação de *N. caninum*.

Nesse contexto, tecido nervoso (cérebro e cerebelo) de duas vacas naturalmente soropositivas, que apresentaram lesões histológicas e com um sólido histórico de abortamentos, foi utilizado para infecção oral de quatro cães soronegativos para *N. caninum*. Outros três cães, igualmente soronegativos, foram mantidos como controles. As fezes desses animais foram acompanhadas

por 25 dias pelo método de flutuação com açúcar (Sheather), na tentativa de investigar a liberação de oocistos não-esporulados do parasito.

Em nenhuma amostra de fezes dos animais, tanto infectados como controles, foram localizados oocistos do parasito. Entretanto, algumas considerações merecem ser mencionadas, como a importância, ainda incerta, desse tipo de infecção, principalmente quanto ao acesso dos predadores ao tecido nervoso infectado de bovinos; qual a estrutura do ciclo (taquizoítos ou cistos teciduais) é de maior importância para essa transmissão e se ela é possível. Outros estudos devem ser conduzidos no sentido de verificar a verdadeira importância dessa via de transmissão de *N. caninum* de bovinos para os cães.

Apoio: FEP - MVZ, Eukanuba e CNPq. * Ver ANEXO II – PRANCHA IV.

7) OCORRÊNCIA DE SOROPOSITIVIDADE PARA *Neospora caninum* ASSOCIADA A PATÓGENOS VIRAIS ABORTIVOS EM VACAS LEITEIRAS NO ESTADO DE MINAS GERAIS, BRASIL

Neospora caninum (Apicomplexa, Sarcocystidae) é um parasito que tem sido relatado mundialmente com variável taxa de prevalência em rebanhos bovinos leiteiros e de corte. São atribuídos a esse coccídeo prejuízos econômicos consideráveis à bovinocultura, expressos na forma de abortamentos, nascimentos de bezerros com baixo peso, fetos mumificados, teratogenia e queda na produtividade de leite.

O Estado de Minas Gerais possui o maior rebanho leiteiro do Brasil e cerca de 21 milhões de cabeças com, conseqüentemente, alto número de abortamentos, em que não se chega ao diagnóstico etiológico. Nos rebanhos mineiros, tem sido relatada a presença de anticorpos para agentes virais abortivos; entre eles, destacam-se herpes-vírus bovino 1 (HVBI) e vírus da diarréia bovina a vírus (VDBV). Anticorpos para *N. caninum* em bovinos leiteiros em Minas Gerais foram relatados a partir de 1999.

Este trabalho objetivou relatar e analisar as ocorrências de soropositividades para *N. caninum* e para HVBI e VDBV em 476 amostras de soro sanguíneo de vacas, coletadas entre novembro de 1996 e maio de 1997, em 15 rebanhos leiteiros não-vacinados contra os dois vírus, localizados em 12 municípios de Minas.

No exame de anticorpos para *N. caninum*, foi utilizado um teste ELISA indireto comercial (HerdCheck®, IDEXX Laboratories, Inc., USA). Anticorpos para HVBI e VDBV foram pesquisados por soroneutralização (O.I.E., 1992), com amostras virais Colorado e NADL, respectivamente.

Do total de amostras pesquisadas (476), 83 (17,44%) foram positivas para *N. caninum*. Para HVBI e VDBV foram encontrados, respectivamente, 165 (34,66%) e 135 (28,36%) amostras positivas. Ainda, entre as amostras testadas, 40 (8,41%) reagiram concomitantemente para os três agentes, 21 (4,41%) foram positivas simultaneamente para *N. caninum* e HVBI, 15 (3,15%) para *N. caninum* e VDBV e 110 (23,11%) para os dois agentes virais.

A ocorrência dos três agentes conjuntamente nas amostras estudadas foi maior do que a ocorrência entre o parasito com qualquer um dos dois agentes virais isolados.

A ocorrência simultânea dos VDBV e HVBI é relatada amplamente na literatura, com o primeiro causando imunodepressão por destruição de linfócitos e a conseqüente liberação do HVBI latente dos gânglios nervosos, confirmando a maior importância do HVBI na expressão da sua sintomatologia. Se isso também acontece com *N. caninum* ainda é incerto, mas, provavelmente, VDBV como agente imunodepressor deva auxiliar, quando há infecção conjunta, na expressão da sintomatologia da neosporose. A associação sinérgica dos patógenos provavelmente altera a epidemiologia da infecção por *N. caninum* em vacas leiteiras. Alguns exemplos clássicos de que sinergismos desse tipo podem ocorrer são observados em pacientes humanos, principalmente naqueles infectados pelo vírus HIV, em que infecções concomitantes por *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium parvum* e *Isospora belli* são exacerbadas pela condição imunossupressora desse retrovírus.

Apoio: CNPq e CAPES.

8) VARIACÃO NA TAXA DE SOROPOSITIVIDADE PARA O *Neospora caninum* EM VACAS LEITEIRAS, DE ACORDO COM O GRAU DE TECNIFICAÇÃO DAS FAZENDAS, NO ESTADO DE MINAS GERAIS, BRASIL

Neospora caninum (Apicomplexa: Sarcocystidae) é um parasito coccídeo, descrito como agente patogênico para bovinos em 1989 e, desde então, vem sendo associado a prejuízos econômicos consideráveis em toda a cadeia produtiva do leite. Perdas da ordem de US\$35 milhões anuais têm sido relatadas na Califórnia e na Nova Zelândia; as perdas econômicas anuais na indústria leiteira podem alcançar NZ\$16 milhões, com perdas econômicas individuais por rebanho variando de NZ\$2,000 a NZ\$4,000. Esses custos incluem os abortamentos, a proporção de vacas descartadas e a reposição do rebanho e a queda na produção leiteira, bem como na produção de gordura no leite.

A descrição inicial de anticorpos para *N. caninum* em rebanhos bovinos do Brasil foi feita inicialmente em 1996. No Estado de Minas Gerais, que possui o maior rebanho leiteiro do Brasil e cerca de 21 milhões de cabeças, anticorpos para o parasito foram relatados recentemente, em 1999. Entretanto, os prejuízos causados pelo parasito nos rebanhos leiteiros de Minas ainda não foram contabilizados, bem como ainda não foram relatados fatores que possam contribuir para maximizar a expressão patogênica desse agente nesses rebanhos.

Este trabalho objetivou relatar uma variação observada na taxa de soropositividade para *N. caninum* em vacas, de acordo com o grau de tecnificação de fazendas leiteiras localizadas no Estado de Minas Gerais, Brasil.

Foram analisadas 544 amostras de soro de vacas, pertencentes a 17 rebanhos leiteiros, que foram classificados em dois grupos: 1) fazendas leiteiras do tipo A/B – 7 rebanhos (224 animais estudados), em que os animais produziam leite de melhor qualidade microbiológica, possuíam controle veterinário permanente, rebanhos com alto grau de pureza racial e, geralmente, tinham alto grau de renovação dos rebanhos (compra e venda), bem como os animais eram criados em “freestall”; e 2) fazendas leiteiras do tipo C – 10 rebanhos (320 animais estudados), cujo leite possuía qualidade microbiológica inferior à do primeiro grupo, principalmente em relação à contagem de coliformes fecais e totais; o controle veterinário era esporádico; e os rebanhos eram compostos geralmente por animais tipo comerciais ou mestiços e criados não-estabulados.

Para detecção de anticorpos para *N. caninum*, foi utilizado um teste ELISA indireto comercial (HerdCheck®, IDEXX Laboratories, Inc., USA), com a leitura dos resultados realizada em um aparelho Multiscan com filtro de 620 nm.

Das 224 amostras testadas pertencentes ao grupo das fazendas produtoras de leite tipo A/B, 65 foram positivas (29,01%) e, das 320 amostras testadas pertencentes ao grupo das fazendas produtoras de leite tipo C, 37 (11,56%) reagiram positivamente para o parasito. Essa diferença provavelmente foi influenciada por fatores como o tipo de criação, o alto grau de trânsito (compra e venda) observado nos rebanhos do primeiro grupo, principalmente pela importação de animais de outros países, e o estresse provocado pela alta produtividade nos rebanhos produtores de leite tipo A/B, que geralmente eram ordenhados três vezes ao dia, entre outros.

Torna-se necessária a execução de estudos que avaliem o ponto ótimo de produção para vacas de leite, minimizando esses fatores e diminuindo, conseqüentemente, os efeitos patogênicos de agentes como *N. caninum* nos rebanhos leiteiros de Minas Gerais.

Apoio: CNPq e CAPES.

9) PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS PARA *Neospora caninum* EM VACAS VACINADAS CONTRA AGENTES ABORTIVOS VIRAIS, EM TRÊS FAZENDAS NO ESTADO DE MINAS GERAIS, BRASIL

Infecções em bovinos por *Neospora caninum* (Apicomplexa: Sarcocystidae) têm sido relatadas em praticamente todo o mundo com uma taxa de prevalência variável. A esse coccídio são atribuídos prejuízos consideráveis ao sistema de produção de leite em vários países, principalmente no que se refere aos abortamentos e à queda na produção leiteira. Entretanto, outros agentes infecciosos também contribuem para esse quadro e, geralmente, também são mal diagnosticados. Este trabalho objetivou relatar a prevalência de anticorpos para *N. caninum* em vacas leiteiras vacinadas contra os vírus da diarréia bovina e vírus (VDBV) e herpes-vírus bovino 1 (HVB1), em três fazendas localizadas em três municípios do Estado de Minas Gerais, Brasil, no mês de março de 1997.

O número mínimo de amostras (n=96) foi determinado utilizando prevalência crítica (50%), intervalo de confiança de 95% e margem de erro de 10% (Thrusfield, 1986). Pelo método de amostragem aleatória simples, foram coletadas e analisadas 100 amostras de soro sanguíneo de vacas vacinadas contra HVB1 e VDBV. A pesquisa de anticorpos para *N. caninum* foi realizada com um teste ELISA indireto comercial (HerdCheck®, IDEXX Laboratories, Inc., USA), e a leitura foi feita em um aparelho Multiscan com filtro de 620 nm. Para atestar a real situação de soropositividade para os HVB1 e VDBV dos rebanhos amostrados, as amostras de soro foram tituladas para esses dois agentes, pelo teste de soroneutralização, utilizando-se as cepas virais Colorado e NADL, respectivamente para HVB1 e VDBV (O.I.E., 1992).

Do total de amostras testadas, 48 (48%) foram positivas para *N. caninum* (intervalo de confiança para a prevalência no mês de março de 1997 variando de 45,6 a 50,4%). Quanto à titulação das amostras para os agentes virais, observou-se uma taxa de soropositividade de 85% (títulos variando de 1:4 a > 1:512) e 76% (títulos variando entre 1:5 e > 1:640), respectivamente para HVB1 e VDBV.

Nos rebanhos estudados, havia sérios problemas de abortamentos e *N. caninum* que até então não tinham sido levados em consideração como agente etiológico dessas perdas reprodutivas, mas mostrou-se, pelo menos sorologicamente, presença muito forte. Entretanto, uma confirmação etiológica definitiva não foi realizada, sendo esse apenas um diagnóstico presuntivo. Em razão disso, torna-se clara a necessidade de acurar-se os meios de diagnóstico diferencial para os agentes abortivos de bovinos, evitando-se a implantação de medidas profiláticas e até mesmo curativas, que representem elevados custos para os pecuaristas, que nem sempre são as mais corretas e indicadas.

Outra situação que merece ser comentada é aquela em que alguns produtos biológicos são postos em dúvida quanto à sua eficácia e, na realidade, muitas vezes são mal prescritos ou mal administrados. Essa situação também foi observada nos rebanhos amostrados, quando, mesmo vacinados contra VDBV e HVBI, agentes sabidamente abortivos, os episódios de abortamentos continuaram a ocorrer.

Apoio: CNPq e CAPES.

10) MANUTENÇÃO E ESTUDO DE CEPAS DE *Neospora caninum* EM CULTIVO CELULAR*

Neospora caninum (Apicomplexa, Sarcocystidae) é um parasito coccídeo que tem o cão como hospedeiro definitivo (McAllister et al., 1998), causando nele principalmente distúrbios neurológicos. Em bovinos, que servem como hospedeiros intermediários (Thilsted & Dubey, 1989), causa uma série de prejuízos econômicos, expressos principalmente como abortamento e queda na produção de leite (Anderson et al., 1991).

O parasito foi isolado inicialmente em 1988 (Dubey et al., 1988), e desde então novas cepas vêm sendo encontradas e estudadas. Em colaboração com a Universidade de Illinois (Dr. Milton McAllister) foram adquiridas as cepas "Beef" e "Illinois" de *N. caninum*, ambas isoladas de bovinos e destinadas ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG. As amostras, ao chegarem ao DMVP em garrafas plásticas de 25 cm², tiveram o seu meio de cultura trocado para Meio Essencial Mínimo (MEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino, sendo mantidas em cultivo celular (células VERO). Após 48 horas, ambas já demonstrando uma média de 30% de efeito citopático, foram repicadas para outras duas garrafas (25 cm²). As cepas foram mantidas por mais 15 passagens *in vitro* e congeladas em nitrogênio líquido com 5% de dimetilsulfóxido (DMSO). Após 24 horas do congelamento, a viabilidade dos taquizoítos de ambas as cepas do parasito foi testada em novas monocamadas de células VERO, indicando um efeito citopático após 12 dias do descongelamento das amostras. Conclui-se que a metodologia descrita foi válida para a manutenção e congelamento dos taquizoítos do parasito.

* Ver ANEXO II – PRANCHA V.

ANEXO II - PRANCHAS

PRANCHA I

Diagnóstico de infecção por *Neospora caninum*

Figura 1 - Placas e reagentes que compõem o “kit” ELISA (IDEXX Laboratories, USA).

Figura 2 - Leitora automática de placas Labsystems Multiskan MS (Finland).

Figura 3 - Bezerra com baixo peso e apresentando fraco desenvolvimento (seta) em comparação com outra da mesma idade, em um rebanho soropositivo para *N. caninum*, no Município de Lavras, MG.

Figura 4 - Feto abortado aos oito meses de idade, no qual foi detectado infecção por *N. caninum*, pelo encontro de anticorpos para o parasito no fluido peritoneal, pelo teste ELISA (foto: cortesia do Prof. Rômulo Cerqueira Leite).

Figura 5 - A artrogripose tem sido relatada como consequência de infecção por *N. caninum*. Na foto, artrogripose em um bezerro Brahman.

Figura 1



Figura 4



Figura 2

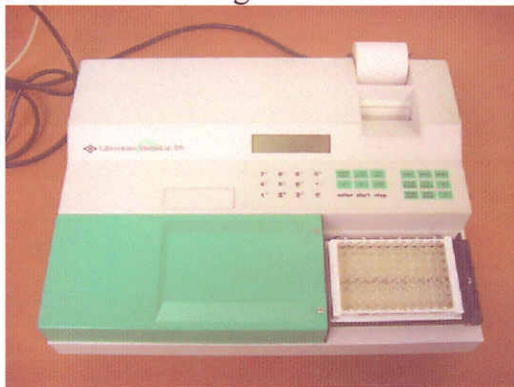


Figura 5



Figura 3



PRANCHA II

Aspectos do trabalho realizado com os canídeos descritos no ARTIGO IV.

Figura 6 - Lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) (Illiger, 1811) (foto: gentileza da Fundação Zôo-Botânica de Belo Horizonte).

Figura 7 - Cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*), (Linnaeus, 1758) (foto: gentileza de Maurício Lemos Rodrigues).

Figura 8 - Lâmina para imunofluorescência usada na detecção de infecção por *N. caninum* nos canídeos estudados (VMRD).

Figura 9 - Lâminas prontas para leitura (VMRD).

Figura 10 - Reagentes utilizados para imunofluorescência (VMRD).

Figuras 11, 12 e 13 - Aspectos da coleta de sangue nos cachorros-do-mato estudados.

Figura 6



Figura 10



Figura 7



Figura 11



Figura 8

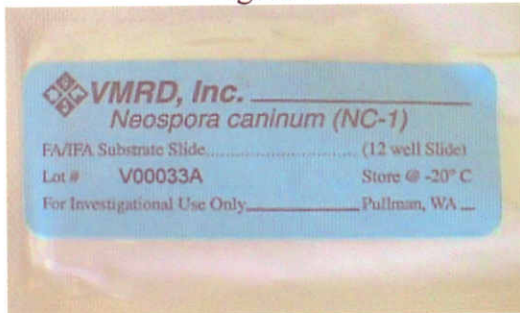


Figura 12



Figura 9

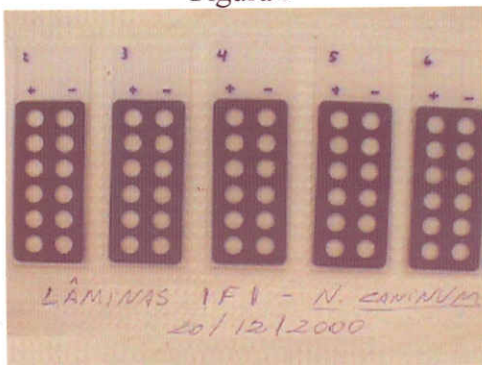


Figura 13



PRANCHA III

Infecção experimental com a cepa de *N. caninum* Illinois e alterações clínicas observadas em gerbils (ANEXO I)

Figura 14 - Gerbils em condições normais. Observar o aspecto de curiosidade e a postura dos animais.

Figura 15 - Inoculação intraperitoneal de um gerbil com uma suspensão de taquizoítos da cepa Illinois em meio de cultura (Meio Essencial Mínimo – MEM).

Figura 16 - Gerbils após seis dias de inoculação e um controle (seta). Observar o comportamento dos animais inoculados, amontoados no canto da caixa. O controle se manteve sem alterações clínicas.

Figura 17 - Outro aspecto dos animais inoculados da Figura 16. Observar o eriçamento dos pêlos dos animais inoculados (setas).

Figura 18 - Gerbil paraplégico após 14 dias de inoculação da cepa de *N. caninum* Illinois. O animal permaneceu vivo por 32 dias, quando foi sacrificado. Observar a ausência de propriocepção do membro posterior direito.

Figura 19 - Mesmo animal da Figura 18, com flacidez da cauda, arrepiamento e emagrecimento.

Figura 20 - Comparação entre o gerbil inoculado da Figura 18 (seta) e um irmão de ninhada não-inoculado. Observar o emagrecimento e a diferença de tamanho dos animais.

Figura 21- Gerbil sacrificado, momentos antes de ser necropsiado.

Figura 14



Figura 18



Figura 15



Figura 19



Figura 16

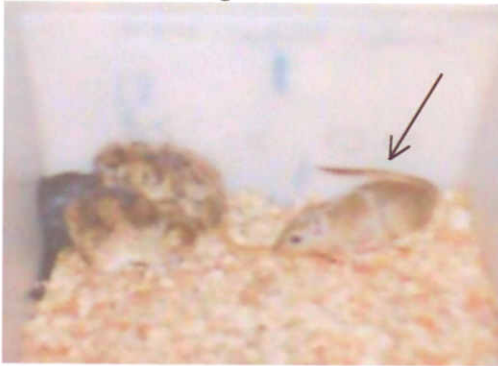


Figura 20



Figura 17

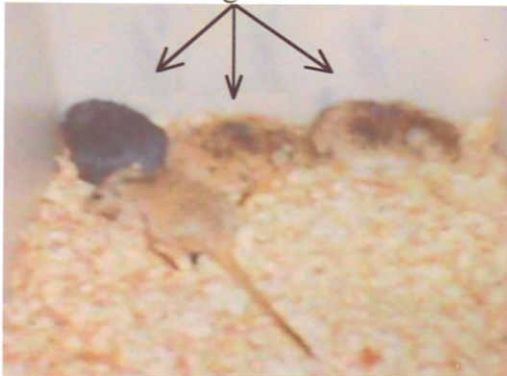


Figura 21



PRANCHA IV

Tentativa de isolamento de oocistos de *N. caninum* de cães inoculados com tecido nervoso de vacas naturalmente soropositivas para o parasito (ANEXO I)

Figuras 22 e 23 - Cadela e ninhada utilizadas no estudo. Os filhotes nasceram no infectório, e todos foram soronegativos para o parasito antes da inoculação com o tecido nervoso das vacas.

Figura 24 - Cabeça de uma das vacas soropositivas no teste ELISA.

Figuras 25 e 26 - Coleta do cérebro e cerebelo das vacas.

Figura 27 - As amostras dos tecidos nervosos foram cortadas em pedaços para inoculação oral dos cães.

Figuras 28 e 29 - Inoculação oral dos cães com o tecido nervoso das vacas soropositivas.

Figura 22



Figura 26



Figura 23



Figura 27



Figura 24

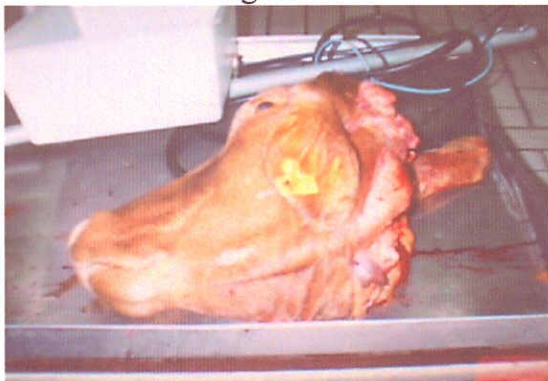


Figura 28

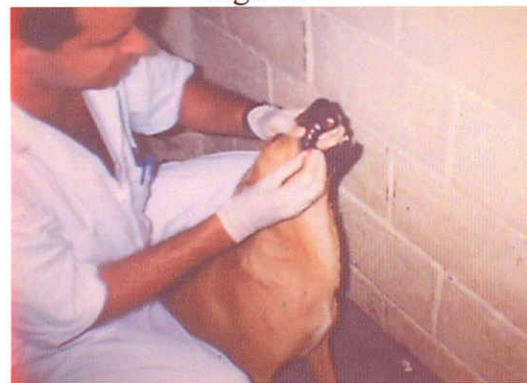


Figura 25



Figura 29



PRANCHA V

Cultivo *in vitro* das cepas Beef e Illinois em células VERO (ANEXO I)

Figura 30 - Garrafas A25 originalmente recebidas com as cepas de *N. caninum* Beef e Illinois em 3 de setembro de 2000, como cortesia do Dr. Milton M. McAllister (University of Illinois, Urbana, Illinois, USA).

Figura 31- Monocamada íntegra de células VERO (ATCC CCL-81) preparada para a sétima passagem dos taquizoítos de *N. caninum*.

Figura 32 - Efeito citopático causado pela cepa Beef, após seis dias de inoculação em células VERO.

Figura 33 - Efeito citopático causado pela cepa Illinois, após cinco dias de inoculação em células VERO.

Figura 30

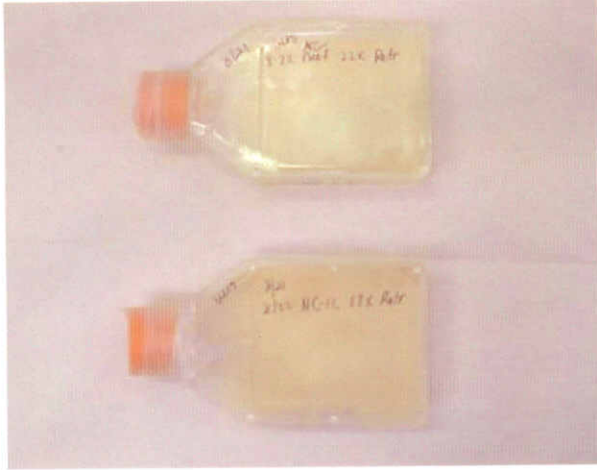


Figura 32



Figura 31

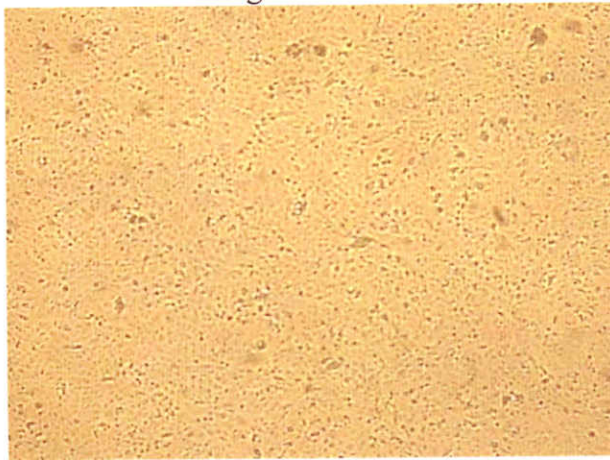
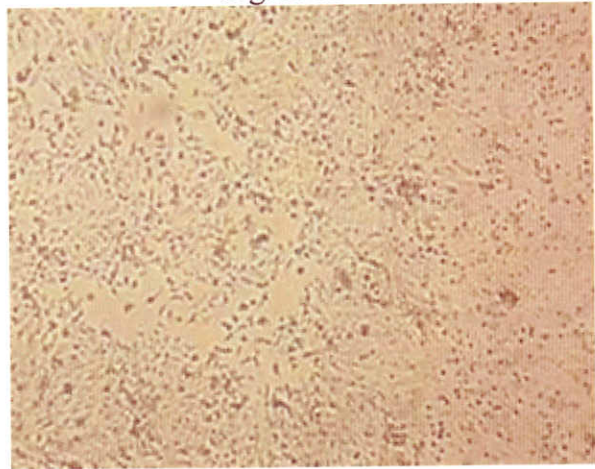


Figura 33



ANEXO III

Questionário aplicado aos responsáveis pelos rebanhos estudados nos capítulos I, II e III

1. DADOS DA PROPRIEDADE E DO PROPRIETÁRIO

Propriedade
Proprietário
Endereço
Telefone/FAX
Município
Data de realização do inquérito
Tipo de exploração pecuária
Número de Ha pasto
Número de Ha total
Tipo de pastagem predominante

2. EFETIVO BOVINO

	Nascidos na propriedade	Adquiridos	Total
Número de bovinos machos de 0 a 6 meses			
Número de bovinos fêmeas de 0 a 6 meses			
Número de bovinos machos de 7 meses a 1,5 ano			
Número de bovinos fêmeas de 7 meses a 1,5 ano			
Número de bovinos machos de 1,5 a 2,5 anos			
Número de bovinos fêmeas de 1,5 a 2,5 anos			
Número de bovinos machos maiores de 2,5 anos			
Número de bovinos fêmeas maiores de 2,5 anos			
Número de vacas			
Número de touros			
Número de bois de serviço			
Número de vacas em ordenha			
Total			
Tipo de sangue predominante	zebu	européu	mestiço

3. INFORMAÇÕES SANITÁRIAS, MANEJO E INSTALAÇÕES

Tem notado diarreia nos animais adultos?	SIM ()	NÃO ()
Qual a frequência?		
Tem havido queda brusca na produção leiteira?	SIM ()	NÃO ()
Se afirmativo, em qual faixa de produção a queda é mais frequentemente observada?		
Tem havido surtos de doenças no rebanho?	SIM ()	NÃO ()
Quantas ordenhas diárias são realizadas?		
Bezerras e novilhas são criadas afastadas do rebanho leiteiro?	SIM ()	NÃO ()
Quais vacinas são utilizadas no rebanho?		
Como é realizada a ordenha?	() Manual, com bezerro ao pé.	
	() Manual, sem bezerro ao pé.	
	() Mecânica.	

Algum destes sintomas já foi observado?:

- Vulvovaginite.
- Balanopostite.
- Problemas respiratórios.
- Problemas oculares.
- descarga óculo-nasal.
- Lesões orais. Como são?
- Hemorragias nas mucosas.
- Diarréia.
- Lesões de casco.

Instalações:

Bezerras:

Novilhas:

Adultos:

Alimentação:

Bezerras:

Novilhas:

Adultos:

Número de animais/ Ha:

Já houve diagnóstico de alguma doença a vírus?

SIM NÃO

Se afirmativo, qual (is)

Já foi feito algum teste sorológico no rebanho?

SIM NÃO

Qual (is)?

Porquê?

Qual o trânsito de animais? De onde vêm e para onde vão?

Quais as vias de acesso utilizadas?

Qual o sistema de criação?

Quais outras espécies que mantém na propriedade?

Importa animais? Se afirmativo, de onde?

4. AVALIAÇÃO REPRODUTIVA E ÍNDICES DE REPRODUÇÃO

Existem falhas reprodutivas?

SIM () NÃO ()

Qual o intervalo médio de partos?

Qual a idade média da vaca à primeira cria?

Qual a idade de descarte das vacas?

Utiliza inseminação artificial?

SIM () NÃO ()

Utiliza transferência de embriões?

SIM () NÃO ()

Quantas doses de sêmen por prenhes?

Há repetição de cio?

SIM () NÃO ()

Tem encontrado aborto?

SIM () NÃO ()

Se afirmativo, qual a faixa etária do animal abortado?

Há nascimento de bezerros cegos, incoordenados ou portadores de outras alterações congênicas?

Há bezerros natimortos?

Como é feita a observação do cio/

Qual a procedência do sêmen utilizado?

Qual a procedência dos touros?

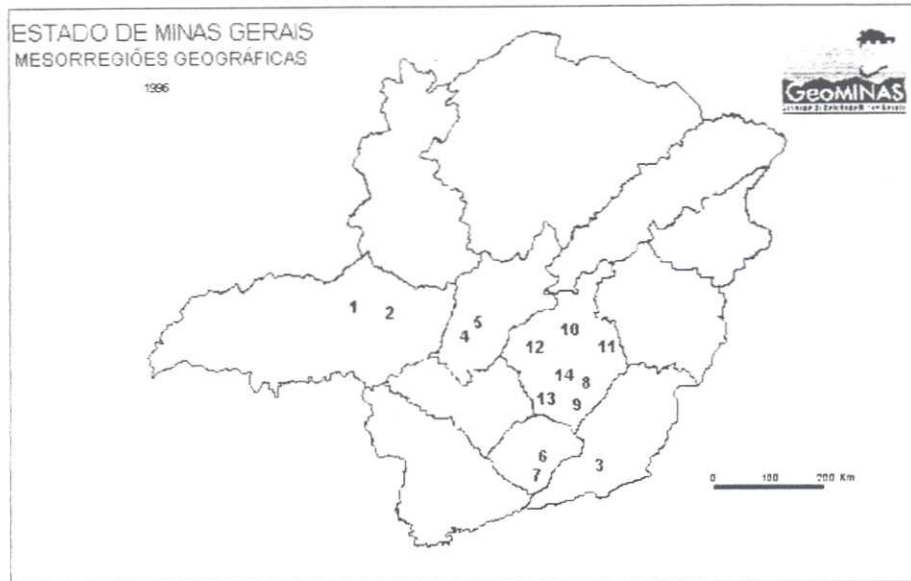
São vacinados?

Contra o quê?

Taxa de fertilidade

ANEXO IV

Figura 34 - Municípios em Minas Gerais onde estavam localizados os rebanhos bovinos analisados nos Capítulos II, III e IV (por mesorregião).



Alto Paranaíba: 1. Patos de Minas e 2. Carmo do Paranaíba.

Zona da Mata: 3. Barbacena.

Central Mineira: 4. Pompeu e 5. Cordisburgo.

Campos das Vertentes: 6. Perdões e 7. Lavras.

Metropolitana de Belo Horizonte: 8. Itabirito, 9. Ouro Preto, 10. Pedro Leopoldo, 11. Caeté, 12. Onça do Pitangui, 13. Igarapé e 14. Betim.