



ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Estudo retrospectivo

**ESTUDO RETROSPETIVO DA BESNOITIOSE BOVINA NA REGIÃO AUVERGNE RHÔNE-ALPES EM
FRANÇA**

Tiphaine Lahondes

Coimbra, junho de 2024



ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Estudo retrospectivo

**ESTUDO RETROSPETIVO DA BESNOITIOSE BOVINA NA REGIÃO AUVERGNE RHÔNE-ALPES EM
FRANÇA**

Coimbra, junho de 2024

Tiphaine Lahondes

Constituição do Júri

Presidente do júri: Pr. Dr. Ferdinando

Bernardino de Freitas

Arguente: Dra. Helga Waap

Orientador: Pra. Elisabete Gomes Martins

Orientador Interno

Pra. Elisabete Gomes Martins

Coorientadores Internos

Pr. Sérgio Ramalho Sousa e Pr. Nuno Carolino

Orientadores externos

Dr. Jean-Michel Arquillère e Dra. Laure Gaudiard





Dissertação do Estágio Curricular do Ciclo de Estudos Conducente ao Grau de Mestre em Medicina
Veterinária da EUVG

Agradecimentos

Ao GDS da região Auvergne Rhône-Alpes em França, pela comunicação dos dados e pela confiança na realização deste trabalho.

Aos meus orientadores internos Elisabete Gomes Martins, Sérgio Ramalho Sousa e Nuno Carolino, sem os quais este trabalho não seria o mesmo. Obrigada pelo acompanhamento nos últimos meses na realização deste grande trabalho, pelos conselhos, as melhorias e pelo tempo dedicado.

As equipas das clínicas veterinárias de Villeneuve Saint Georges, de Saint Pourçain sur Sioule, e de Langogne. Um agradecimento especial pelos numerosos estágios realizados nas vossas clínicas, a aprender este trabalho tão maravilhoso, a cuidar dos bichos de qualquer formato que seja, a realizar diversos atos. Obrigada pela confiança e pelos momentos agradáveis que vivi convosco. Fazem parte da medicação veterinária que me tornou hoje.

A Emma, minha parceira de curso na EUVG. Obrigada por todos estes momentos ao teu lado, pela cumplicidade, pela ajuda, pelos conselhos. És o meu melhor encontro francês em Portugal. Espero que a gente continue juntas, de perto ou de longe, para os numerosos anos da nossa carreira de veterinária que vêm, e os seguintes.

A Agathe e a Marine, por ter partilhado essa aventura em Portugal também, pelos bons momentos ao vosso lado durante estes anos de estudo.

A Manon e a Perrine, minhas amigas desde já muitos muitos anos. Pelos momentos partilhados nas piscinas de França em competições, e por todas as saídas juntas que continuam a existir, apesar da distância.

A Tita e a Vitória, minha portuguesa e minha brasileira favoritas, minhas sereias. Obrigada pela integração em Portugal, pela ajuda na aprendizagem da língua desde o primeiro dia na piscina, e pelos numerosos momentos partilhados! Nunca vos esquecerei, e espero que tenhamos ainda vários momentos de alegria juntas.

Aos nadadores e treinadores dos Sharks e da AAC, obrigada pelo acolhimento nessas duas equipas de nadadores, pelos momentos partilhados fora da água e por todas as memórias.

Aos meus pais, Gilles e Carole, sem os quais nada do meu sonho acordado teria acontecido. Obrigada pelo suporte durante todos esses anos, nos bons e nos menos bons momentos, pelas risadas, pelos valores transmitidas e por tudo que faz que sou a pessoa que toda gente conhece hoje. Amo-vos tanto.

A minha irmã, Virginie, que amo ao infinito. Obrigada por ter cuidado de mim desde o início, apesar do temperamento que posso ter as vezes, que conheces tão bem, porque tens o mesmo! Mesmo se continuo a viver longe de ti, espero que continuaremos nos ver e partilhar momentos inesquecíveis juntas e em família.

Ao meu cunhado, Arthur, pelos bons momentos passados juntos desde mais da metade da minha vida, e para cuidar da minha irmã desde já alguns anos, e nos próximos. E obrigada também para me levar em todos os lados como se fosse o seu 3º bebé durante as férias.

Aos meus sobrinhos, William e Clément. Obrigada pelos momentos de loucura que temos, mesmo que as vossas idades, não estão sempre a realizar. Amo-vos tanto, e espero que venham muitas vezes de férias na quinta da “tata Tiphaine” e do “tonton Antoine”.

Ao meu avô paterno, lá no céu, sem o qual esta aventura em Portugal se calhar nunca teria acontecido. Foste tu que me puxou a candidatar, para realizar o meu sonho. Obrigada por tudo, e espero que estejas orgulhoso de mim e da mulher que me tornei.

A minha avó paterna, que continua a cuidar de mim como sempre fez. Agora, vou enfim começar a minha vida de adulta, e voar das minha próprias asas. Obrigada por tudo que fizeste para mim, e continua a cuidar de ti para que partilhemos ainda muitos momentos juntas.

Aos meus avós maternos, desaparecidos demasiado cedo. Também espero que estejam orgulhosos de mim lá no céu. Obrigada pelos anos ao vosso lado.

Ao Antoine, meu amor, esse Homem que entrou na minha vida já há mais de 3 anos, de maneira tão súbita. Não foi sempre fácil suportar a imensa distância que nos separava, mas ficamos juntos e saímos mais fortes. Obrigada pelo suporte diário, pela aprendizagem da vida na quinta ao teu lado e por tudo que faz com que me tornei a melhor versão de mim próprio. Amo-te para sempre.

Aos meus sogros, pela recepção na vossa grande família, e pela benevolência. Obrigada.

Índice geral

Índice de figuras.....	v
Índice de gráficos	v
Índice de tabelas.....	v
Lista de siglas, símbolos e abreviaturas	vi
Resumo	2
Palavras-chave:	2
Abstract	3
Key words	3
1. Introdução	4
2. Materiais e métodos	7
2.1 seleção das explorações e recolha de dados	7
2.2 análise estatística.....	9
3. Resultados	11
4. Discussão	20
5. Conclusão.....	23
Referências bibliográficas	24

Índice de figuras

Figura 1: Representação geográfica da distribuição do número de explorações ativas em 2020, 2021, 2022 e 2023, por departamento.....	12
Figura 2: Proporção de explorações amostradas em 2020, 2021, 2022 e 2023, por departamento. ...	13
Figura 3: a) Maior proporção de explorações analisadas num ano por departamento, observada no período total dos 4 anos do estudo; b) Número de explorações ativas no ano em que houve a maior proporção de explorações analisadas em cada departamento, no total dos 4 anos (2021 e 2022 foram os melhores anos).	14
Figura 4: Prevalência observada em cada departamento, no ano em que se realizou a testagem do maior número de explorações no departamento.....	16

Índice de gráficos

Gráfico 1: Probabilidade de uma exploração ter uma análise positiva de acordo com o número de análises feitas ($p < 0,01$).	19
--	----

Índice de tabelas

Tabela 1: Número de explorações ativas e proporção de explorações analisadas por departamento e por ano.....	11
Tabela 2: Número de explorações amostradas por departamento e por ano.	13
Tabela 3: Prevalência da Besnoitiose bovina por departamento e por ano (IC95%: Intervalo de confiança a 95%; N°obs. (%): número de observações e proporção relativa às explorações ativas)	15
Tabela 4: Proporção de novas explorações positivas, relativamente ao ano anterior.	17
Tabela 5: Frequências absoluta e relativa de explorações pelo menos uma vez positivas e de explorações sempre negativas, no total dos 4 anos.	17
Tabela 6: Frequências absoluta e relativa de explorações que deixaram de ser positivas em relação ao ano anterior, em cada departamento.	18
Tabela 7: Frequências absoluta e relativa de explorações em risco ou negativas.....	18

Lista de siglas, símbolos e abreviaturas

EFSA: European Food Safety Authority

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

GDS: Groupement de Défense Sanitaire (FR) / Agrupamento de Defesa Sanitária (PT)

IFAT: Imunofluorescent Antibody Test

PCR: Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)

OR: Odds Ratios

ESTUDO RETROSPETIVO DA BESNOITIOSE BOVINA NA REGIÃO AUVERGNE RHÔNE-ALPES EM FRANÇA

Tiphaine Lahondes^a, Nuno Carolino^a, Sérgio Ramalho de Sousa^a, Elisabete Gomes Martins^a

^a Departamento de Ciências Veterinárias, Escola Universitária Vasco da Gama, Av. José R. Sousa Fernandes 197, Campus Universitário, Lordemão, 3020-210, Coimbra, Portugal
(lahondes.tiphaine@gmail.com; nuno.carolino@euvg.pt; sergio.sousa@euvg.pt; elisabete.martins@euvg.pt)

Resumo

A Besnoitiose bovina é uma doença parasitária causada pelo parasita *Besnoitia besnoiti*. É uma doença classificada como emergente pela EFSA em 2010, devido ao aparecimento de novos casos em vários países europeus. Os animais infetados, são maioritariamente assintomáticos, funcionando como reservatório do agente; a apresentação clínica pode ser aguda ou crónica. A doença é associada a perdas económicas, tornando necessária a implementação de medidas de controlo. O Agrupamento de Defesa Sanitária da região Auvergne Rhône-Alpes em França, implementou nos últimos anos, um programa voluntário de monitorização da presença da infeção em bovinos leiteiros, através da análise de leite de tanque das explorações. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a distribuição e evolução da doença no período de 01/01/2020 a 01/07/2023. Foram analisados os resultados oficiais de análises de leite de tanque das 7552 explorações leiteiras dos 12 departamentos da região. As amostras de leite foram analisadas em laboratórios certificados, através de ELISA indireto (ID Screen® *Besnoitia* Milk Indirect, laboratório IDVET). Foram determinadas as estatísticas descritivas, as proporções amostrais e a prevalência da doença em cada ano e em cada departamento e investigada a influência dos fatores departamento, ano da análise e tipo de exploração, no risco de uma exploração ser positiva. Os resultados indicam que a prevalência variou significativamente ($p < 0.01$) no período de análise e entre departamentos. O número de animais na exploração em 2023, o número de análises realizadas por cada ano, e o tipo de produção influenciaram significativamente o risco de uma exploração ser positiva.

Palavras-chave: *Besnoitia besnoiti*, Bovinos leiteiros, França, Prevalência, Região Auvergne Rhône-Alpes

Abstract

Bovine Besnoitiosis is a parasitic disease caused by the parasite *Besnoitia besnoiti*. It was classified as an emerging disease by EFSA in 2010, due to the appearance of new cases in several European countries. Infected animals are mostly asymptomatic, acting as a reservoir for the agent; the clinical presentation can be acute or chronic. The disease is associated with economic losses, making it necessary to implement control measures. In recent years, the Health Defense Group of the Auvergne Rhône-Alpes region in France has implemented a voluntary program to monitor the presence of the infection in dairy cattle, through the analysis of tank milk from farms. The aim of this study was to assess the distribution and evolution of the disease from 01/01/2020 to 01/07/2023. The official results of tank milk analyses from 7552 dairy farms in the region's 12 departments were analyzed. The milk samples were analyzed in certified laboratories using an indirect ELISA (ID Screen® Besnoitia Milk Indirect, IDVET laboratory). Descriptive statistics, sample proportions and the prevalence of the disease in each year and in each department were determined and the influence of the factors department, year of analysis and type of farm on the risk of a farm being positive was investigated. The results indicate that prevalence varied significantly ($p < 0.01$) over the period of analysis and between departments.

Key words: *Besnoitia besnoiti*, Dairy cows, France, Prevalence, Auvergne Rhône-Alpes region

1. INTRODUÇÃO

A Besnoitiose bovina é uma doença causada pelo parasita *Besnoitia besnoiti*, que pertence ao filo Apicomplexa, família Sarcocystidae e subfamília Toxoplasmatinae (Álvarez-García *et al.*, 2014). Foi descrita pela primeira vez em 1884 no Sul da França por Cadéac, como uma doença que afeta a pele dos bovinos, que designou de Elefantíase (Cortes *et al.*, 2014). Em 1912, nos Pireneus, Besnoit e Robin descobriram que esta doença é causada por um parasita, tendo então sido descrita como Sarcosporidiose, apesar de terem identificado algumas diferenças relativas à doença causada por *Sarcocystis* spp. (Cortes *et al.*, 2014). O surgimento da doença na Europa, no final do século XIX e início do século XX em Portugal e França, poderá ser explicado pelo comércio de animais provenientes de África (Saegerman *et al.*, 2022).

O conhecimento relativo ao ciclo de vida do parasita permanece incompleto. Trata-se de um ciclo heteroxeno, cujo hospedeiro definitivo ainda não está identificado (Hornok Sándor *et al.*, 2014). Descobertas recentes sugerem que o hospedeiro definitivo poderá ser um carnívoro e, mais precisamente, a raposa vermelha (González-Barrio *et al.*, 2021), mas essa possibilidade carece de confirmação. Os ruminantes domésticos e selvagens parecem ser os hospedeiros intermediários (Coelho *et al.*, 2023).

A doença é transmitida horizontalmente, por via direta ou indireta (Álvarez-García *et al.*, 2013). A transmissão direta ocorre por contacto entre mucosas de um animal parasitado e de um animal saudável. A transmissão indireta, considerada a mais frequente, é realizada por insetos hematófagos que podem ser moscas dos géneros *Glossina*, *Tabanus* ou da espécie *Stomoxys calcitrans* (Álvarez-García *et al.*, 2013). A transmissão iatrogénica resultante da reutilização de agulhas hipodérmicas entre diversos animais também constitui um risco de transmissão indireta (Bigalke, 1968).

Relativamente ao ciclo de vida, o hospedeiro definitivo desconhecido elimina oocistos para o ambiente. Estes podem ser ingeridos pelo hospedeiro intermediário, que fica infetado (Waap, 2015). Nele, o parasita diferencia-se em taquizoítos, que se vão replicar nas células endoteliais dos vasos sanguíneos e, por vezes, em monócitos e neutrófilos. Numa fase mais tardia da infeção, os taquizoítos diferenciam-se em bradizoítos, enquistando-se em células como fibroblastos, miofibroblastos, células endoteliais e células do músculo liso (Dubey *et al.*, 2013). A multiplicação dos taquizoítos e o enquistamento dos bradizoítos correspondem, respetivamente, às fases agudas e crónicas da doença (Álvarez-García *et al.*, 2013).

Foram identificadas dez espécies diferentes de *Besnoitia* (Cortes *et al.*, 2014), divididas em dois grupos filogeneticamente diferentes: um que inclui as espécies *B. akodoni*, *B. darlingi*, *B. oryctofelisi* e um outro que inclui as espécies *B. besnoiti*, *B. bennetti*, *B. tarandi* e *B. jellisoni* (Kiehl *et al.*, 2010). Seis espécies infectam roedores (*B. akodoni*, *B. neotomofelis*, *B. jellisoni*, *B. wallacei*), lagomorfos (*B. oryctofelisi*), marsupiais e lagartos (*B. darlingi*), enquanto as quatro restantes (*B. besnoiti*, *B. tarandi*, *B. caprae* e *B. bennetti*) infectam ungulados domésticos e selvagens, e respetivamente bovinos e antílopes, renas e boi almiscarado, caprinos, e burros e cavalos (Waap, 2015). *B. besnoiti* também afeta espécies selvagens como o gnu azul, o leão africano, o impala e o kudu, em África (Malatji *et al.*, 2023).

A doença é considerada como endémica em África subsaariana, países da Europa do Sul e do Este e na Ásia (Alzieu *et al.*, 2007). No entanto, desde 2010, é considerada como re-emergente na Europa pela EFSA, devido ao aumento progressivo do número de casos (EFSA, 2010). De facto, estende-se agora à Itália, Alemanha, Suíça, Croácia, Hungria, Bélgica e Irlanda (Basso *et al.*, 2013; Hornok Sándor *et al.*, 2014; Ryan *et al.*, 2016; Delooz *et al.*, 2021). Foram também reportados casos em Israel, Rússia, China, Cazaquistão, Coreia do Sul, Uzbequistão e Venezuela (Olias, 2011).

Clinicamente, a Besnoitiose bovina é caracterizada por uma sucessão de três fases: a fase febril, em que ocorre hipertermia (40,8 até 41,6°C), sinais clínicos inespecíficos que podem ser despercebidos como depressão, aumento dos linfonodos, perda de peso, fotofobia, descargas nasais e oculares e hiperestesia da pele (Schulz, 1960); a fase dos edemas ou anasarca, que ocorre por aumento da permeabilidade vascular decorrente da multiplicação rápida dos taquizoítos nas células endoteliais (G. Álvarez-García *et al.*, 2014); e a fase de esclerodermia (fase crónica), caracterizada pela formação de quistos com bradizoítos, em várias membranas, mucosas e tecidos conjuntivos, sendo a localização principalmente na esclera e conjuntiva considerada patognomónica (G. Álvarez-García *et al.*, 2014). A maioria dos animais infetados permanece assintomática e apenas uma pequena proporção de animais desenvolve sinais clínicos (1-10% em zonas endémicas; 15-20% em zonas emergentes) (Jacquiet *et al.*, 2010). Foi observada uma taxa de mortalidade de 10% (Bigalke, 1968). Os animais assintomáticos representam uma ameaça na exploração, pois podem atuar como fonte de infeção para os animais saudáveis (Cortes *et al.*, 2014).

A Besnoitiose bovina foi associada a perdas económicas severas, relacionadas nomeadamente com a perda de condição corporal, a diminuição da produção de leite, a infertilidade (transitória a definitiva) nos machos, abortos e baixa qualidade dos couros (Álvarez-García *et al.*, 2013). O controlo é difícil e existe uma vacina viva atenuada disponível em alguns países que não está disponível na Europa. As sulfonamidas podem ser eficazes na redução dos sintomas na fase aguda, mas não atuam na fase

cronica da doença porque o parasita já se encontra enquistado (Jacquiet *et al.*, 2010; Grisez *et al.*, 2020). Hoje em dia, estudos confirmaram a expansão geográfica da doença na Europa, com aumento da prevalência em bovinos (Álvarez-García, 2016).

A doença pode ser diagnosticada por métodos diretos ou indiretos.

O diagnóstico direto pode ser realizado mediante histopatologia de biopsia de pele com lesões, considerado o *gold-standard* (Waap, 2015). As amostras de pele deverão ter 8 mm de diâmetro, recolhidas geralmente em animais cronicamente infetados (Cortes *et al.*, 2006). O diagnóstico por reação em cadeia da polimerase convencional (PCR) ou em tempo real (PCR-RT) a partir de amostras de pele tem uma sensibilidade superior aos métodos indiretos, em vacas com infeção aguda (Cortes *et al.*, 2014).

Os métodos indiretos baseiam-se na pesquisa de anticorpos específicos no soro de animais com infeção clínica ou subclínica (Cortes *et al.*, 2014). O teste de anticorpos imunofluorescentes, do inglês *Imunofluorescent Antibody Test* (IFAT) apresenta maior sensibilidade do que o teste de ensaio de imunoabsorção enzimática, do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) (Sambo *et al.*, 2014). Não existem reações cruzadas entre anticorpos de *B. besnoiti* e taquizoítos de *T. gondii* e *N. caninum* (Cortes *et al.*, 2014). O teste ELISA também é muito utilizado nos estudos epidemiológicos. Quando um soro testa positivo num teste ELISA, é posteriormente realizado um teste de *Western-blot*, geralmente. Este permite identificar os verdadeiros positivos e evitar possíveis reações cruzadas com outros parasitas do filo Apicomplexa (como *Neospora* spp. ou *Sarcocystis* spp.) (Gutiérrez-Expósito *et al.*, 2016). A combinação de testes serológicos seguidos da PCR permite aumentar a probabilidade de deteção da doença (Álvarez-García *et al.*, 2013).

A região Auvergne Rhône-Alpes, uma das 18 administrativas de França, é diversificada e extensa, estendendo-se em quase 70 000 km² divididos em 12 departamentos. Inclui um mosaico de diferentes paisagens, com as montanhas Jura, Alpes e o Massif Central com a região vulcânica, os grandes lagos e as planícies dos departamentos do Rhône, Isère, Allier ou Loire e ainda zonas de montanha média. Cerca de 70% da supercilie da região é classificada como zona de montanha, e três quartos da superfície são áreas de espaços verdes naturais e de atividade agrícola muito desenvolvida (INSEE, 2021).

Nos últimos anos, tem sido identificada a presença de um crescente número de animais doentes e de explorações bovinas infetadas na área geográfica da região Auvergne Rhône-Alpes, França. Esta região não é a mais afetada pela Besnoitiose bovina em França, mas alguns departamentos que a constituem

são vizinhos de zonas endémicas, o que levou o Agrupamento de Defesa Sanitária (*Groupement de Défense Sanitaire*, GDS) da região, a implementar procedimentos de monitorização das explorações. O rastreio da Besnoitiose bovina não é de carácter obrigatório. No entanto, desde o ano de 2021, é muito aconselhado e alguns departamentos (Ain, Ardèche, Drôme, Isère e Rhône) assumem total ou parcialmente os custos de diagnóstico da infeção, realizado paralelamente com os planos oficiais de controlo de doenças.

Perante a situação atual, é importante caracterizar a distribuição e evolução da infeção, em todos os departamentos da região, de modo a informar o GDS sobre necessidades e estratégias futuras relativamente à Besnoitiose bovina.

O presente estudo tem por objetivo caracterizar a presença da infeção por *Besnoitia besnoiti* nas explorações de bovinos de leite na região Auvergne Rhône-Alpes e a evolução dos planos de controlo, através de um estudo retrospectivo dos resultados dos testes realizados nas explorações, no âmbito dos programas de monitorização realizados pelo GDS. Pretende-se determinar a prevalência de explorações infetadas, considerando como unidades geográficas os diferentes Departamentos da região, e a sua evolução no período de 01/01/2020 e 01/07/2023.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

A realização deste estudo recebeu parecer favorável da Comissão de ética da EUVG. Os dados utilizados são propriedade do Agrupamento de Defesa Sanitária da região Auvergne Rhônes-Alpes, e foram cedidos para utilização exclusiva no presente estudo, sendo garantida a confidencialidade e anonimidade dos mesmos.

2.1 SELEÇÃO DAS EXPLORAÇÕES E RECOLHA DE DADOS

O presente trabalho é um estudo retrospectivo que teve por base todos os dados referentes aos resultados da pesquisa de *Besnoitia besnoiti* realizados em amostras de leite de tanque, das explorações de bovinos de leite localizadas nos 12 departamentos da Região de Auvergne Rhône-Alpes, no período de 01/01/2020 a 01/07/2023. Em cada departamento os programas oficiais de controlo e profilaxia de doenças, de periodicidade anual, são realizados em todas as explorações entre o início de outubro e o final de abril. As ações realizadas no âmbito destes planos oficiais visam a Rinotraqueíte Infecciosa Bovina, a Brucelose, a Leucose, a Tuberculose e Hipodermose. No decorrer das visitas no âmbito dos planos oficiais foram recolhidas amostras de leite do tanque de cada

exploração, no momento da recolha do leite na exploração e seu transporte até a indústria. As amostras de leite foram analisadas no laboratório oficialmente designado no âmbito dos programas oficiais. O número amostras de leite recolhidas em cada exploração no referido período foi variável e dependeu das doenças monitorizadas e do estatuto sanitário de cada exploração. Além da monitorização analítica obrigatória das doenças constantes nos programas oficiais, as amostras recolhidas foram também analisadas para a pesquisa do agente da Besnoitiose.

Os critérios para realização da pesquisa de Besnoitiose foram a existência de requisição de testagem pelo produtor ou, a realização de testagem sistemática realizada por iniciativa do GDS, mediante permissão do produtor. Neste caso o GDS de cada departamento suporta os custos de análise. Foram consideradas elegíveis todas as explorações de leite, existentes em cada Departamento. Destas, um número variável foi testado em cada ano, no período em estudo. Todos os animais em ordenha no momento da visita dos serviços oficiais foram incluídos na amostra composta, obtida por recolha de leite de tanque após pelo menos uma ordenha completa. Estes animais, de um modo geral, apresentavam idade superior a 24 meses. Não foi recolhida a informação individual sobre a raça de cada bovino presente nas explorações avaliadas, mas, na generalidade, nos registos oficiais do GDS predomina a raça Montbéliard, seguida da raça Prim Holstein. Os animais de sexo masculino não foram considerados no estudo.

Uma vez obtidas, as amostras eram enviadas para o laboratório para análise (laboratório Agrolabs, para 9 dos 12 departamentos da região; laboratório LDA, no departamento Ain; laboratório LIDAL, nos departamentos Savoie e Haute-Savoie). Todos os laboratórios utilizaram os mesmos procedimentos e testes. As amostras de leite eram congeladas após a recolha, e analisadas no prazo de 1 mês após receção pelo laboratório. Os resultados eram comunicados mensalmente e registados pelos serviços oficiais do GDS em base de dados própria (base de dados para as doenças não regulamentares: AGDS). O teste de diagnóstico utilizado, foi o ELISA indireto ID Screen® Besnoitia Milk Indirect (Laboratório IDVET, 310 Rue Louis Pasteur 34790 Grabels, France) que permite a deteção de anticorpos dirigidos contra o parasita *Besnoitia besnoiti* no leite de tanque, com uma especificidade de 100% e uma sensibilidade elevada em explorações com uma prevalência elevada de animais infetados, mas dependente do número de animais em ordenha no tanque de leite (ID.Vet, 2023).

No teste ELISA indireto ID Screen® Besnoitia Milk Indirect, apenas as cúpulas pares são sensibilizadas com um extrato antigénico purificado de *B. besnoiti*. As amostras e os controlos são distribuídos nas cúpulas pares e ímpares. Os anticorpos específicos de *B. besnoiti*, quando presentes, formam um complexo anticorpo-antigénio. Um conjugado anti-ruminante marcado com Peroxidase (HRP) é

distribuído nas cúpulas e vai-se fixar aos anticorpos anti-*B. besnoiti*, formando um novo complexo antígeno-anticorpo-conjugado-HRP. É posteriormente realizada uma lavagem para eliminar o excesso do conjugado, e a reação é revelada após adição duma solução de revelação (TMB). A intensidade de coloração que aparece depende da quantidade de anticorpos específicos presentes na amostra a testar. Na presença de anticorpos na amostra, aparece uma cor azulada que se torna amarelada após bloqueio. Na ausência de anticorpos na amostra, não há coloração. A leitura é feita à 450 nm. Para validação, os cálculos são baseados no valor da densidade óptica de cada amostra (igual à densidade óptica da coluna par menos a densidade óptica da coluna ímpar). O teste é válido se a média da densidade óptica dos controlos positivos é superior a 0,350.

Na interpretação, para cada amostra, o rácio entre a densidade óptica da amostra e a do controle negativo é calculado. As amostras com um rácio inferior ou igual à 35% são consideradas como negativas. As amostras com um rácio superior a 35% são consideradas como positivas.

Os resultados existentes na base de dados da AGDS foram extraídos em suporte informático, para Excel (Microsoft Excel, versão 2016) em 1 de julho de 2023, retrospectivamente até 1 de janeiro de 2020, para todas as explorações de bovinos de leite (explorações cujos bovinos adultos são produtores de leite) ou mistas (explorações cujos bovinos adultos são produtores de leite ou de carne), existentes em cada um dos departamentos da Região de Auvergne Rhône-Alpes.

Durante o período a que se referem os dados, algumas explorações encerraram, outras iniciaram atividade, ou converteram da produção de leite para produção de bovinos de carne. Adicionalmente, também a proporção de explorações controladas por departamento (relativamente à totalidade das explorações ativas) foi variável em função da conveniência das atividades dos planos oficiais. Assim, o nº de explorações analisadas é diferente em cada ano, totalizando 7552 explorações leiteiras e mistas na região. Os dados recolhidos incluíram a identificação individual da totalidade das explorações ativas em cada ano (número e nome), a sua localização geográfica por departamento, e o tipo de produção (leite ou misto). Nas explorações amostradas foram adicionalmente recolhidos o número de amostras analisadas por exploração em cada ano, e o número de análises com resultado positivo em cada exploração e em cada ano. Foi ainda recolhido o número de animais presentes, por exploração, à data da extração dos dados, em julho de 2023.

2.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística utilizou-se o programa SAS® 9.4 (SAS Institute Inc., 2019). Inicialmente determinaram-se as estatísticas descritivas dos dados disponíveis, através do PROC FREQ do programa

SAS. Estimaram-se as frequências das explorações analisadas e com resultados positivos por departamento, de acordo com o tipo de produção e por ano (2020, 2021, 2022 e 2023). Posteriormente, através do PROC MEANS do programa SAS, foram calculadas as médias da percentagem de explorações positivas por departamento e por ano, os respetivos erros padrão e intervalos de confiança. Foi efetuada a análise de variância da prevalência de Besnoitiose bovina, através do PROC GLM do programa SAS, com um modelo que incluiu os efeitos do departamento e do ano da recolha e, posteriormente, foram estimadas as médias dos quadrados mínimos da prevalência por departamento e por ano. A prevalência foi calculada através da proporção de explorações positivas relativamente ao número total de explorações testadas no período de tempo considerado. Assim, para cada ano e em cada departamento, foi calculada a prevalência da doença e respetivo intervalo de confiança a 95%.

Através do programa Microsoft Excel® calculou-se a proporção de explorações analisadas por departamento e por ano, dividindo o número de explorações analisadas pelo número total de explorações ativas em cada departamento, no respetivo ano. Foram criados mapas para caracterização da distribuição de explorações por Departamento e das respetivas proporções de explorações testadas, para cada ano. Foram também calculados o número e a proporção (em %) de novas explorações positivas, relativamente ao ano anterior; o número e a proporção de explorações com pelo menos uma amostra com resultado positivo no período total do estudo (4 anos); o número e proporção de explorações que deixaram de ser positivas, em relação ao ano anterior e o número e correspondente proporção de explorações sempre negativas no período total do estudo. Por último, também foram calculados o número e percentagem de explorações em risco.

Foram considerados no presente estudo os resultados do total de 35 334 análises efetuadas no período em estudo, designadamente entre 2020 e 2023 (em 2023 apenas se utilizaram dados recolhidos até 01/07/2023).

A probabilidade das explorações serem positivas à Besnoitiose bovina foi investigada através de análise de regressão logística, com o PROC LOGISTIC do programa SAS e do teste de Wald, considerando como variável dependente, a positividade da exploração e, como variáveis explanatórias independentes, o Departamento, o nº de resultados disponíveis, o nº de animais na exploração e o ano de observação. A investigação comparada do risco de uma exploração ser positiva à Besnoitiose bovina foi realizada calculando os rácios de probabilidade (*Odds Ratios*), considerando diversos fatores de risco, nomeadamente, o departamento onde se localiza a exploração, o ano da análise e o tipo de exploração (exploração leiteira Vs Exploração mista) e, para uma amostra mais reduzida, o número total de

análises efetuadas em cada exploração (apenas para o ano 2022) e o número total de animais na exploração (apenas para o ano de 2023).

3. RESULTADOS

Foram consideradas globalmente na análise um total de 7552 explorações, nas quais em 2023 existiam 800 391 animais. Estas explorações correspondem ao total de explorações de vacas de leite registadas em cada um dos 12 Departamentos no ano de 2020. O nº de explorações ativas por localização geográfica no departamento e por ano apresenta-se na figura 1 e detalha-se na tabela 1. A amostragem e testagem das explorações, por departamento e por ano (tabela 2) foi variável. A proporção de explorações analisadas por departamento foi igual ou superior a 95% do total de explorações existentes em 29 dos 48 Departamentos-Ano estudados; inferior a 95%, mas maior que 83%, em 6 dos Departamentos-Ano. Em 13 dos Departamentos-Ano estudados, a proporção de explorações analisadas foi inferior a 21%. Em todos os Departamentos-ano, em que a proporção de explorações amostradas foi inferior a 21%, pelo menos num ano, a proporção de explorações analisadas foi superior a 95% (tabela 1).

Tabela 1: Número de explorações ativas e proporção de explorações analisadas por departamento e por ano.

Departamento	Nº Explorações ativas (a) e proporção (%) de explorações analisadas (b)							
	2020		2021		2022		2023	
	(a)	(b)	(a)	(b)	(a)	(b)	(a)	(b)
Ain	503	92,80%	503	98,20%	498	98,40%	496	98,20%
Allier	57	0	57	0	57	100%	57	0
Ardèche	202	95%	202	97%	199	99,50%	199	95,50%
Cantal	1251	7,50%	1251	96,20%	1251	93,30%	1251	85,90%
Drôme	65	0	65	98,50%	65	98,50%	64	0
Isère	356	95,20%	356	97,50%	355	98,90%	352	1,70%
Loire	958	99,40%	958	99,90%	958	100%	923	99,20%
Haute-Loire	1208	90,10%	1208	99,30%	1201	95,90%	1194	93,80%
Puy-de-Dôme	957	0	957	96,30%	954	20,10%	940	87,60%
Rhône	578	98,10%	570	97,50%	558	98,20%	545	97,10%
Savoie	576	0	576	100%	575	97,60%	572	1,70%
Haute-Savoie	841	0	841	99,90%	841	98,30%	834	2%
TOTAL	7552	48,20%	7544	90,00%	7512	91,60%	7427	55,2%

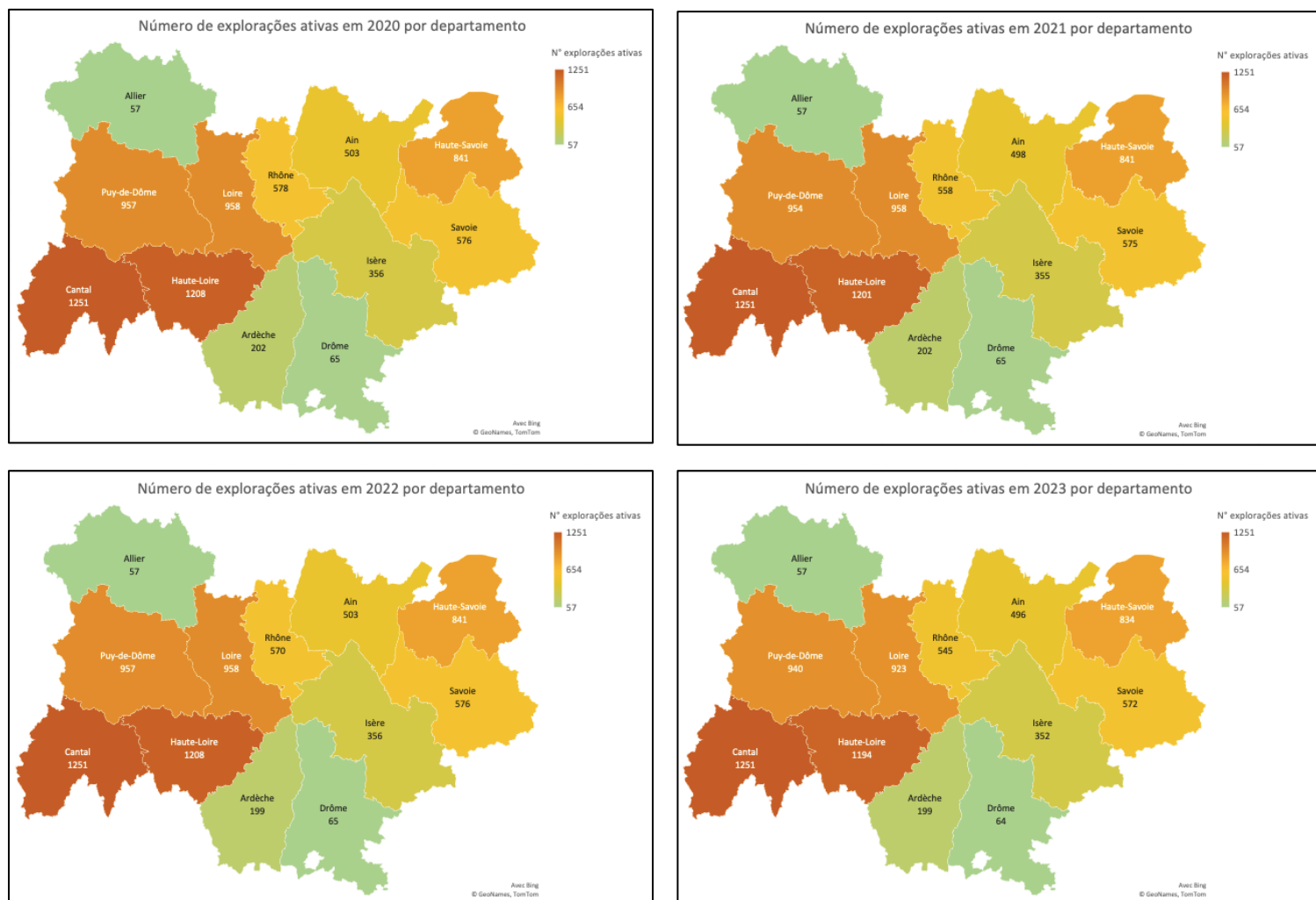


Figura 1: Representação geográfica da distribuição do número de explorações ativas em 2020, 2021, 2022 e 2023, por departamento.

A proporção de explorações amostradas encontra-se caracterizada por departamento e por ano na figura 2. A figura 3 representa a maior proporção de explorações analisadas em cada departamento, no total dos 4 anos, além do número de explorações ativas correspondentes, em cada departamento e ano.

Tabela 2: Número de explorações amostradas por departamento e por ano.

Departamento	2020	2021	2022	2023
Ain	467	494	490	487
Allier	0	0	57	0
Ardèche	192	196	198	190
Cantal	94	1203	1167	1074
Drôme	0	64	64	0
Isère	339	347	351	6
Loire	952	957	958	916
Haute-Loire	1088	1199	1152	1120
Puy-de-Dôme	0	922	192	823
Rhône	567	556	548	529
Savoie	0	576	561	10
Haute-Savoie	0	840	827	17
TOTAL	3699	7354	6565	5172

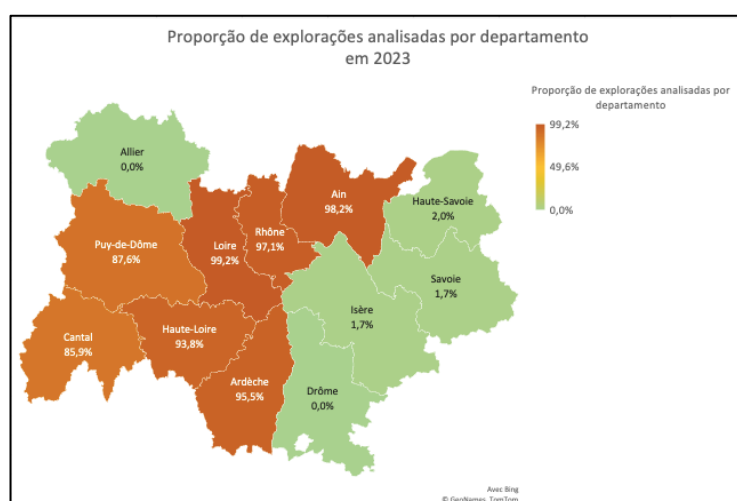
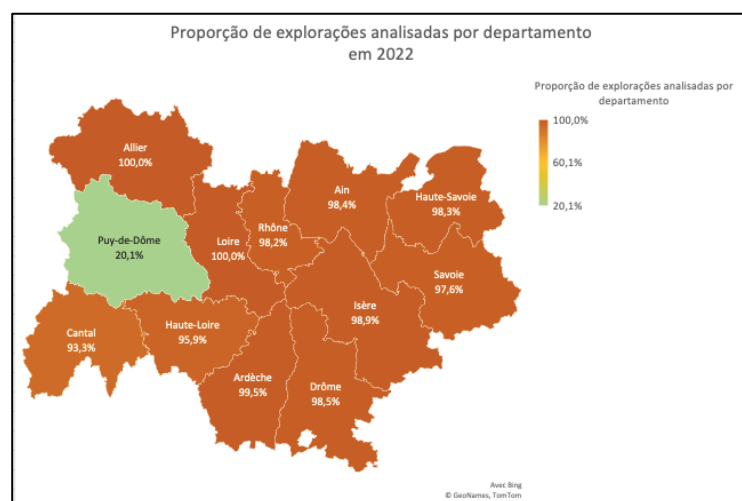
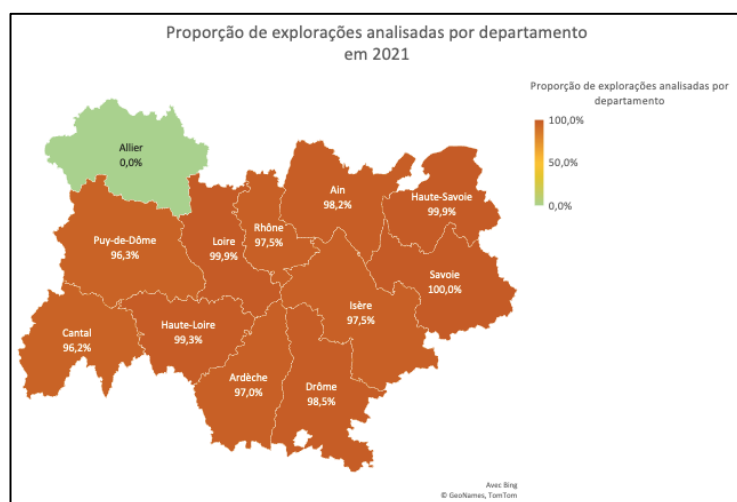
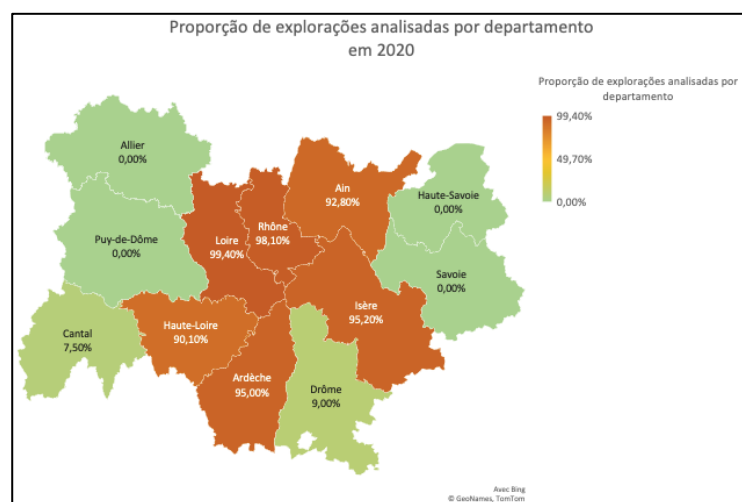


Figura 2: Proporção de explorações amostradas em 2020, 2021, 2022 e 2023, por departamento.

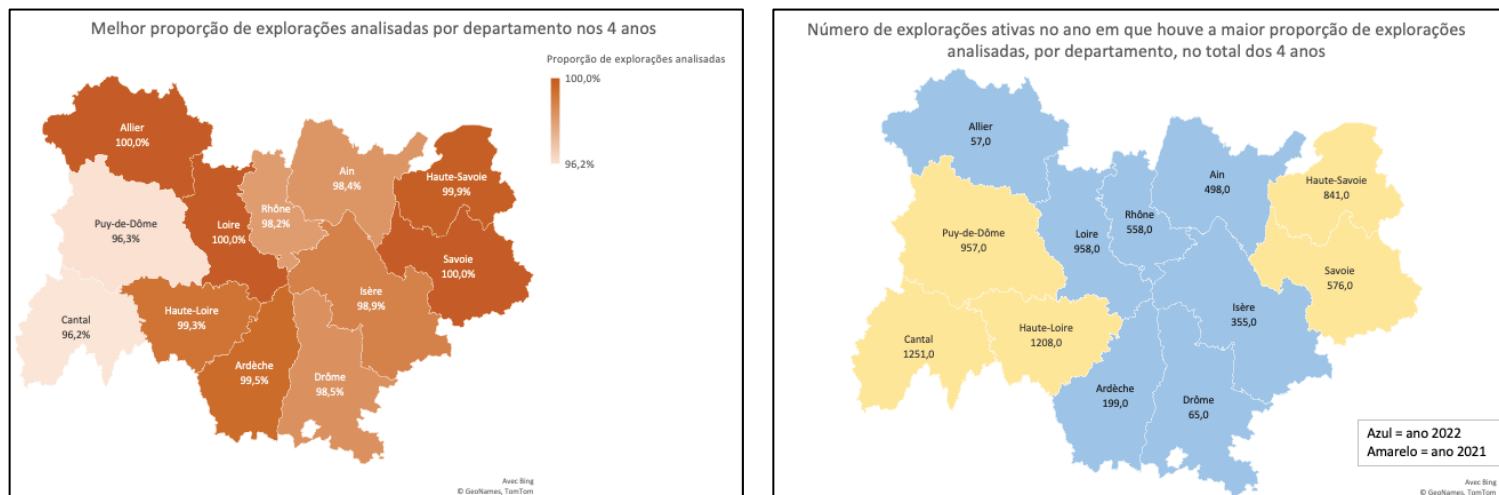


Figura 3: a) Maior proporção de explorações analisadas num ano por departamento, observada no período total dos 4 anos do estudo; b) Número de explorações ativas no ano em que houve a maior proporção de explorações analisadas em cada departamento, no total dos 4 anos (2021 e 2022 foram os melhores anos).

Das explorações observadas, 6230 são leiteiras e 1281 são de tipo misto. Adicionalmente, observaram-se 39 explorações de tipo leiteiro, que no último ano de estudo, mudaram de tipo de produção para aleitante, e duas para engorda.

Durante o período de estudo, observou-se o encerramento de explorações conforme se detalha: em 2020, 8 explorações no departamento Rhône; em 2021 encerraram 32 (5 em Ain; 3 em Ardèche; 1 em Isère; 7 em Haute-Loire; 3 em Puy-de-Dôme; 12 em Rhône e 1 em Savoie); em 2022, encerraram atividade 47 explorações (1 no departamento de Drôme, 2 em Isère, 7 em Haute-Loire, 14 em Puy-de-Dôme, 13 em Rhône, 3 em Savoie e 7 em Haute-Savoie); até julho de 2023, encerraram 23 explorações (1 no departamento Ardèche, 1 na Isère, 7 na Haute-Loire, 5 no Puy-de-Dôme, 5 no Rhône e 4 na Savoie).

Durante o período de estudo (2020-2023), iniciaram atividade um total de 20 explorações de produção de leite (em 2020: 3 na Haute-Loire, 1 no Puy-de-Dôme, 1 no Rhône e 1 na Savoie; em 2021: 4 no Rhône e 1 na Savoie; em 2022: 2 na Haute-Loire, 3 no Puy-de-Dôme e 3 no Rhône; em 2023: 1 na Haute-Loire).

Das 35334 análises feitas durante o período, 33 301 tiveram resultado negativo (94,25%) e 2033 tiveram resultado positivo (5,75%).

A prevalência da infecção por *Besnoitia besnoiti* por Departamento e por ano, apresenta-se na tabela 3. A Ardèche foi o Departamento com a maior prevalência em 2020 (10,94%). Em 2021, passou a ser a Savoie com 23,44%, que continuou com o valor mais alto da região em 2022 (17,83%). Em 2023, até a data de extração dos dados, o Departamento da Isère apresentava a prevalência mais elevada (16,67%).

Foi elaborado um mapa que traduz de forma visual a prevalência por departamento determinada para cada departamento no ano em que no mesmo foi testada a maior proporção de explorações (figura 4).

Tabela 3: Prevalência da Besnoitiose bovina por departamento e por ano (IC95%: Intervalo de confiança a 95%; N°obs. (%): número de observações e proporção relativa às explorações ativas).

Departamento	Ano	Prevalência			
		Média	IC95%		N°obs (%)
Ain	2020	1,50%	-0,15%	3,15%	467 (92,8%)
	2021	2,23%	0,62%	3,83%	494 (98,20%)
	2022	5,51%	3,90%	7,12%	490 (98,40%)
	2023	4,52%	2,90%	6,14%	487 (98,20%)
Allier	2020				0 (0%)
	2021				0 (0%)
	2022	5,26%	2,98%	8,32%	57 (100%)
	2023				0 (0%)
Ardèche	2020	10,94%	7,07%	14,81%	192 (95%)
	2021	8,67%	4,84%	12,50%	196 (97%)
	2022	7,58%	3,77%	11,39%	198 (99,5%)
	2023	5,26%	1,37%	9,15%	190 (95,5%)
Cantal	2020	7,45%	1,99%	12,91%	94 (7,5%)
	2021	6,07%	4,54%	7,59%	1203 (96,2%)
	2022	7,46%	5,91%	9,00%	1167 (93,3%)
	2023	10,61%	9,00%	12,23%	1074 (85,9%)
Drôme	2020				0 (0%)
	2021	7,81%	1,44%	14,18%	64 (98,5%)
	2022	6,25%	-0,12%	12,62%	64 (98,5%)
	2023				0 (0%)
Isère	2020	8,55%	5,58%	11,53%	339 (95,2%)
	2021	6,63%	3,68%	9,57%	347 (97,5%)
	2022	10,26%	7,33%	13,18%	351 (98,9%)
	2023	16,67%	-5,72%	39,05%	6 (1,7%)
Loire	2020	2,63%	1,72%	3,53%	952 (99,4%)
	2021	2,09%	1,19%	2,99%	957 (99,9%)
	2022	1,88%	0,98%	2,78%	958 (100%)
	2023	1,64%	0,72%	2,56%	916 (99,2%)

Haute-Loire	2020	6,71%	5,10%	8,32%	1088 (90,1%)
	2021	8,01%	6,47%	9,54%	1199 (99,3%)
	2022	10,94%	9,37%	12,50%	1152 (95,9%)
	2023	6,34%	4,75%	7,93%	1120 (93,8%)
Puy-de-Dôme	2020				0 (0%)
	2021	1,84%	0,75%	2,94%	922 (96,3%)
	2022	6,25%	3,84%	8,66%	192 (20,1%)
	2023	3,52%	2,36%	4,69%	823 (87,6%)
Rhône	2020	1,06%	0,30%	1,82%	567 (98,1%)
	2021	0,36%	-0,41%	1,13%	556 (97,5%)
	2022	0,73%	-0,05%	1,51%	548 (98,2%)
	2023	1,32%	0,53%	2,11%	529 (97,1%)
Savoie	2020				0 (0%)
	2021	23,44%	20,14%	26,74%	576 (100%)
	2022	17,83%	14,48%	21,17%	561 (97,6%)
	2023	10,00%	-15,05%	35,05%	10 (1,7%)
Haute-Savoie	2020				0 (0%)
	2021	8,81%	6,93%	10,69%	840 (99,9%)
	2022	8,32%	6,29%	10,35%	721 (98,3%)
	2023	6,56%	1,62%	11,50%	122 (2%)

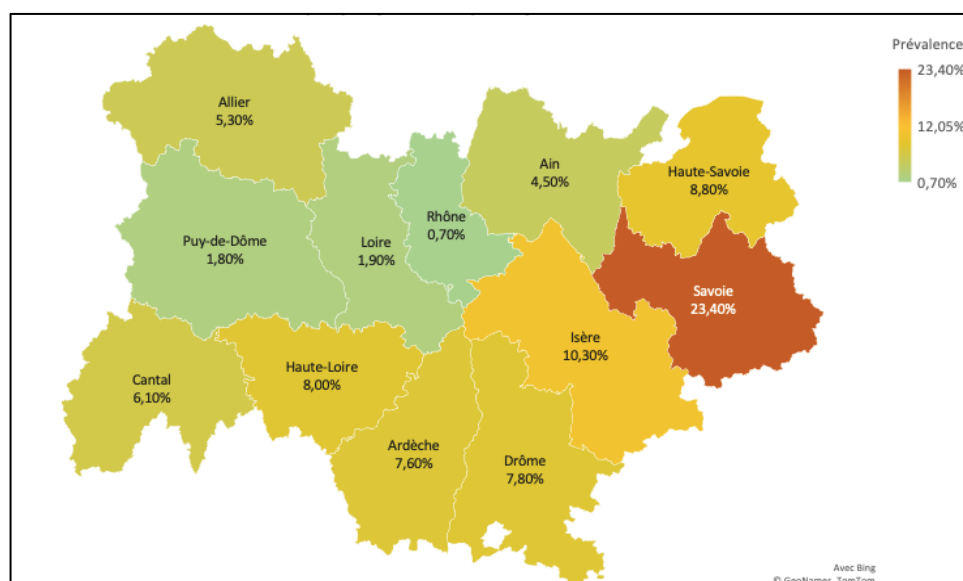


Figura 4: Prevalência observada em cada departamento, no ano em que se realizou a testagem do maior número de explorações no departamento.

Quando quantificadas as novas infeções (explorações positivas pela primeira vez, relativamente ao ano anterior (tabela 4) verificou-se um acréscimo de 10,1% de explorações a tornaram-se positivas em

2021. Em 2022, observaram-se mais 3,5% de novas explorações positivas face ao ano anterior. Em 2023 com as explorações testadas até o dia 01 de julho já existiam mais 2% de novas explorações positivas.

Tabela 4: Proporção de novas explorações positivas, relativamente ao ano anterior.

Departamento	2021 Vs. 2020 % (n)	2022 Vs. 2021 % (n)	2023 Vs. 2022 % (n)
Ain	1,9% (9)	4,5% (22)	1,6% (8)
Allier	0,0% (0)	- (3)	- (0)
Ardèche	3,6% (7)	3,6% (7)	1,5% (3)
Cantal	72,3% (68)	4,2% (51)	5,9% (69)
Drôme	(5)	1,6% (1)	0% (0)
Isère	0,9% (3)	4,6% (16)	0% (0)
Loire	1,5% (14)	1,4% (13)	1,3% (12)
Haute-Loire	3,6% (39)	5,4% (65)	1,1% (13)
Puy-de-Dôme	(17)	0,9% (8)	9,9% (19)
Rhône	0,4% (2)	0,7% (4)	0,9% (5)
Savoie	(135)	5,4% (31)	0,2% (1)
Haute-Savoie	(74)	4,0% (34)	0,0% (0)
TOTAL	6,4%	7,6%	5,2%

No total dos 4 anos, 905 (de 7552, i.e. 12%) explorações foram positivas pelo menos uma vez, enquanto as restantes 6647 (88%) permaneceram negativas (tabelas 5).

Tabela 5: Frequências absoluta e relativa de explorações pelo menos uma vez positivas e de explorações sempre negativas, no total dos 4 anos.

Departamento	Explorações pelo menos uma vez positivas	Explorações sempre negativas
Ain	8,9% (45)	91,1% (458)
Allier	5,3% (3)	94,7% (54)
Ardèche	17,3% (35)	82,7% (167)
Cantal	14,9% (186)	85,1% (1065)
Drôme	9,2% (6)	90,8% (59)
Isère	13,2% (47)	86,8% (309)
Loire	6,5% (62)	93,5% (896)
Haute-Loire	15,5% (187)	84,5% (1021)
Puy-de-Dôme	4,5% (43)	95,5% (914)
Rhône	2,9% (17)	97,1% (561)
Savoie	28,8% (166)	71,2% (410)
Haute-Savoie	12,8% (108)	87,2% (733)
TOTAL	12,0% (905)	88% (6647)

Além disso, o número de explorações que deixaram de ser positivas (em relação ao ano anterior), por departamento, também foi calculado. Assim, em 2021, foram 68 que voltaram a ser negativas. Em 2022, estavam 228 e em 2023, 359 (tabela 6).

Tabela 6: Frequências absoluta e relativa de explorações que deixaram de ser positivas em relação ao ano anterior, em cada departamento.

Departamento	2020	2021	2022	2023
Ain		1,1% (5)	1,2% (6)	2,7% (13)
Allier				5,3% (3)
Ardèche		5,7% (11)	4,6% (9)	3,5% (7)
Cantal		2,1% (2)	3,1% (37))	3,6% (42)
Drôme			3,1% (2)	6,3% (4)
Isère		2,7% (9)	0,9% (3)	10,0% (35)
Loire		2,0% (19)	1,6% (15)	1,6% (15)
Haute-Loire		1,5% (16)	2,9% (35)	5,9% (68)
Puy-de-Dôme			1,4% (13)	1,0% (2)
Rhône		1,1% (6)	0,4% (2)	0,4% (2)
Savoie			11,5% (66)	17,8% (100)
Haute-Savoie			4,8% (40)	8,2% (68)
TOTAL		1,8% (68)	3,1% (228)	5,5% (359)

A proporção de explorações em risco também foi calculada (tabela 7). Em 2020, havia 95% de explorações em risco em todos os departamentos. Em 2021, essa percentagem baixou em 94%, continuando até 92% em 2022, ano em que houve o número mais elevado de explorações positivas durante o estudo. Em julho de 2023, voltou a ser de 95%.

Tabela 7: Frequências absoluta e relativa de explorações em risco ou negativas.

Departamento	2020	2021	2022	2023
Ain	98,5% (460)	97,8% (483)	94,5% (463)	95,5% (465)
Allier			94,7% (54)	
Ardèche	89,1% (171)	91,3% (179)	92,4% (183)	94,2% (179)
Cantal	92,6% (87)	93,9% (1130)	92,5% (1080)	89,4% (960)
Drôme		92,2% (59)	93,8% (60)	
Isère	91,4% (310)	93,4% (324)	89,7% (315)	83,3% (5)
Loire	97,4% (927)	97,9% (937)	98,1% (940)	98,4% (901)
Haute-Loire	93,3% (1015)	92,0% (1103)	89,1% (1026)	93,7% (1049)
Puy-de-Dôme		98,2% (905)	93,8% (180)	96,5% (794)
Rhône	98,9% (561)	99,6% (554)	99,3% (544)	98,7% (522)
Savoie		76,6% (441)	82,2% (641)	90,0% (9)
Haute-Savoie		91,2% (766)	91,8% (759)	100,0% (17)
TOTAL	95% (3531)	94% (6881)	92% (6065)	95% (4901)

A probabilidade das explorações serem positivas à Besnoitiose bovina depende significativamente do efeito conjunto do departamento e do ano de análises ($p < 0,01$) e do número de animais presentes na exploração ($p < 0,05$). A cada animal a mais na exploração, a probabilidade de ser positiva aumenta de 0,002%. No entanto, considerando que o número de animais em 2022 é igual ao número de animais em 2023, não houve associação significativa entre o número de animais na exploração e a probabilidade de ter resultado positivo em 2022. No conjunto dos departamentos, a probabilidade de uma exploração ter uma análise positiva depende significativamente ($p < 0,01$) do número de análises a que foi submetida. Em média, por cada análise adicionalmente efetuada, a probabilidade da exploração ser positiva (relativamente à probabilidade anterior) aumenta de 82,8%. A probabilidade de uma exploração ter uma análise positiva é de 4,1% quando se efetua apenas uma análise, aumentando, para 7,3%, 12,6% e 20,9%, respetivamente, quando se efetuam duas, três e quatro análises (gráfico 1). O risco de uma exploração ser positiva em função do tipo de produção (Leite vs Mista) foi também investigado. Quer individualmente nos anos 2021, 2022 e 2023, mas também no período global do estudo, a probabilidade da exploração ser positiva é superior quando é de tipo Mista. Apenas não se observaram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre tipos de produção no ano de 2020.

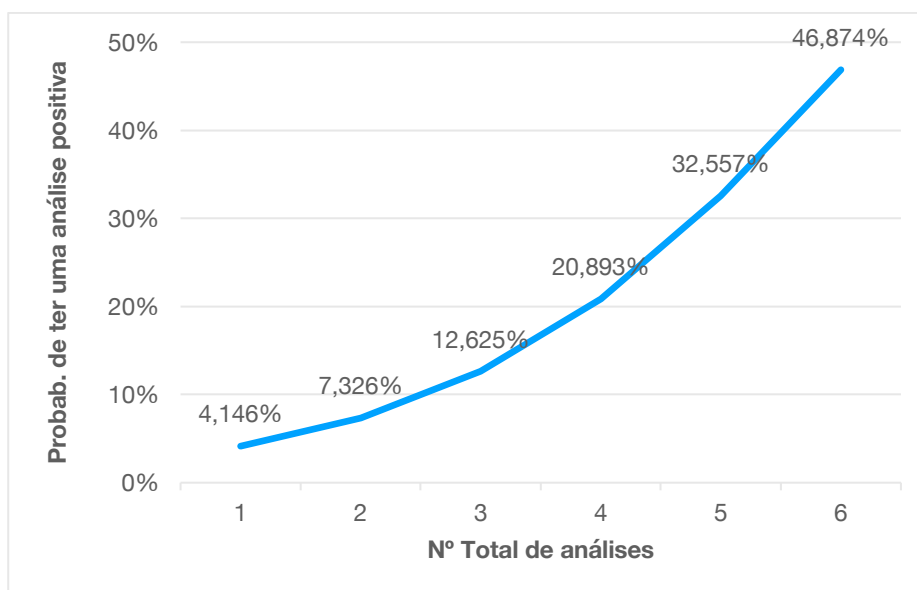


Gráfico 1: Probabilidade de uma exploração ter uma análise positiva de acordo com o número de análises feitas ($p < 0,01$).

Foram calculados os rácios de probabilidade (Odds ratio, OR) de cada departamento ser positivo, considerando o Departamento do Rhône o departamento com a probabilidade mais baixa de ter explorações positivas. O Departamento da Savoie tem um OR de ter explorações positivas, 19,031

vezes superior ao Departamento de Rhône. Foram também calculados os OR de uma exploração testar positiva em função do ano de análise, tomando como ano de referência o ano de 2021, que é o ano com o maior número de análises feitas. Os OR 2020 vs 2021 é 1,104, os OR 2022 vs 2021 é 1.261 e os OR 2023 vs 2021 é 1.289. Assim, o ano em que as explorações têm menor OR de serem positivas é o de 2021.

4. DISCUSSÃO

A Besnoitiose bovina é uma doença que começa com a aparição de sinais clínicos inespecíficos, pelos quais existem vários diagnósticos diferenciais: febre catarral maligna, erlichiose granulocítica bovina, febre catarral ovina, doença respiratória bovina, fotossensibilização, sarna e deficiência em zinco, entre outras (Saegerman *et al.*, 2022). Durante vários anos, esta doença foi desconsiderada, mas com o aumento do número de casos nas duas últimas décadas, estudos sobre a prevalência da doença e a sua disseminação são essenciais para tentar limitar a sua expansão.

A prevalência da Besnoitiose bovina parece depender de alguns fatores de risco, tais como a idade dos animais, aptidão ou raça (Coelho *et al.*, 2023). De facto, a aptidão dos animais influencia, e os bovinos de carne são mais afetados, ainda que, mais recentemente, o número de casos também aumentou em vacas de leite (Anastácio *et al.*, 2022). Este facto está relacionado com o regime de exploração maioritariamente extensivo dos bovinos de carne, com pastagem no exterior a maioria do ano e possível proximidade com rebanhos infetados. Além disso, entram mais facilmente em contacto com os ruminantes selvagens, que têm o papel de reservatório ou hospedeiros intermediários (Gutiérrez-Expósito *et al.*, 2016), e com os vetores hematófagos, cuja atividade é mais intensa no verão (Pols, 1960). No entanto, o parasita não sobrevive muito tempo no vetor (1h em *S. calcitrans*, 3h em *Glossina brevipalpis* e até 24h em tabanídeos) (Bigalke, 1968), o que significa que a transmissão apenas ocorre em curtas distâncias.

A idade também parece relevante, pois as vacas mais velhas têm maior seropositividade (95% de seropositividade em vacas com mais de quatro lactações, contra 61% de seropositividade em vacas de primeira lactação) (Ryan *et al.*, 2016). Além disso, as vacas de um a três anos de idade, além das de mais de sete anos de idade, com exposição prolongada e contínua ao vetor, são mais em risco (Coelho *et al.*, 2023). A doença, raramente afeta vitelos com menos de seis meses de idade, mas estes podem ser seropositivos após ter ingerido colostro de mães positivas (Villa *et al.*, 2019) e Diezma-Díaz *et al.* (2017) encontraram um caso de Besnoitiose num vitelo de menos de seis meses de idade.

A raça também já foi estudada enquanto fator de risco e, recentemente, Coelho *et al.* (2023) mostraram que as raças Salers e Charolesas parecem mais suscetíveis, enquanto vacas de raça cruzada parecem mais resistentes.

Relativamente ao sexo, vários autores não encontraram diferenças significativas entre os machos e as fêmeas (Sambo *et al.*, 2014; Waap *et al.*, 2014; Coelho *et al.*, 2023).

Alguns parâmetros topográficos e climáticos como a altitude e a localização geográfica parecem também influenciar sobre a prevalência da Besnoitiose bovina. De facto, a altitude parece ser um fator de risco, e animais nas pastagens numa altitude acima de 600m parecem ter uma maior seroprevalência (Álvarez-García *et al.*, 2014).

Neste estudo também foi observado que os diferentes departamentos não estão afetados da mesma maneira. De facto, a doença está a progredir em França, seguindo um gradiente do Sul para o Norte (FRGDS Auvergne Rhône-Alpes, 2023). Alguns departamentos tomaram medidas de saneamento que permitiram melhorias, como é o caso por exemplo da Ardèche, da Loire e do Rhône, em que a prevalência anual diminuiu no período de estudo. Outros departamentos têm mais dificuldades ou atuam como “zonas tampão”, com departamentos vizinhos de outras regiões que são também bastantes afetadas (Cantal e Haute-Loire nomeadamente). Além disso, os departamentos da Savoie e Haute-Savoie, Ain, Isère e Puy-de-Dôme são zonas de pastoreio no verão. São pastoreados no verão por animais de outros departamentos, que podem ser positivos à Besnoitiose bovina, o que pode explicar a maior prevalência nestes departamentos.

A prevalência variou entre anos em cada departamento. O valor mais baixo foi de 0,36% no departamento do Rhône em 2021, enquanto o valor mais alto foi de 23,44% no departamento da Savoie em 2021, tendo sido nesse mesmo ano analisadas respetivamente 97,5% e 100% das explorações ativas. Em alguns departamentos, em algum ano a proporção de explorações analisadas foi reduzida ou nula, o que não permite ter um conhecimento da prevalência correspondente. No entanto, para todos os departamentos existe em pelo menos um ano (e na maioria, para todos os anos), uma proporção de explorações analisadas correspondente a mais de 96,2% das explorações ativas, conferindo uma grande representatividade aos valores de prevalência encontrados.

Ainda existem poucos estudos de prevalência da Besnoitiose bovina feitos a partir de amostras de leite de tanque, pois a maioria foram feitos em soro. Numa exploração em Portugal de vacas leiteiras, a seroprevalência individual intra-exploração em vacas que já pariram uma vez foi de 59,8% (Anastácio *et al.*, 2022). Ryan *et al.* (2016) encontraram resultados próximos, com 68% dos animais seropositivos

para *B. besnoiti* numa exploração leiteira na Irlanda. Numa exploração leiteira em Itália, Villa *et al.* (2019) encontraram uma seroprevalência de 43,5% em vacas. Grisez *et al.*, em 2020, estudaram 8 explorações de bovinos em França (de leite e de carne) cuja prevalência inter-explorações foi compreendida entre 42 e 92%. Em comparação, a seroprevalência em bovinos de carne variou entre 89,4% e 100% na primeira exploração naturalmente infetada por *B. besnoiti* na Alemanha (Gollnick *et al.*, 2018). Numa zona endémica de Espanha, em explorações de vacas de carne, a seroprevalência aparente atingiu 19,7% (Álvarez-García *et al.*, 2014).

Neste estudo, apenas temos a prevalência de cada departamento ao nível da exploração, não sendo possível obter a prevalência individual intra-exploração, pois os animais não foram testados individualmente em cada exploração leiteira.

Além disso, o leite de tanque analisado num dado momento reflete apenas o estatuto das vacas que estão a ser ordenhadas neste momento. Não foram incluídas as vacas secas, novilhas e vitelos, nem as vacas cujo leite é eliminado (recém-paridas, vacas com mastite ou em tratamento). Visto que o estudo foi feito à escala das explorações, e não dos animais, não sabemos quantas vacas em cada exploração são positivas. Adicionalmente, o teste ELISA utilizado tem uma elevada especificidade ($Sp = 100\%$), mas uma sensibilidade variável que é elevada em explorações com uma prevalência individual elevada, mas baixa a muito baixa em explorações com baixa prevalência individual (ID.Vet, 2023). Assim, pode haver subestimação da prevalência em explorações com baixo número de animais infetados.

No presente estudo existiam registos de 39 explorações “aleitantes” que fizeram a análise em 2020, 2021 e 2022, mas que na maioria, não fizeram a análise em 2023, visto que o período de estudo parou no dia 01/07/2023. Também não existem dados relativos à data de fim de atividade, pelo que apenas podem ser feitas suposições sobre esta data. Isto pode prejudicar alguns resultados.

A Besnoitiose bovina afeta o bem-estar dos animais e tem um impacto económico considerado de medio a elevado para os produtores (Waap, 2015). A maior prevalência está associada aos departamentos que são zonas de pastoreio no verão, onde bovinos de outros departamentos são agrupados nas pastagens. Assim, o controlo da besnoitiose bovina é muito importante, e medidas de biossegurança e biocontenção devem ser implementadas, através de testes serológicos antes da introdução dum animal no rebanho (Grisez *et al.*, 2020). Nas explorações com prevalência inferior a 10%, o refugo dos animais seropositivos ou clinicamente afetados deve ser feito o mais rapidamente possível, com separação do resto do rebanho. Mas quando a prevalência sobe acima de 10%, esta estratégia é mais difícil de implementar (Grisez *et al.*, 2020). Nenhuma vacina está licenciada na

Europa, pois trata-se de vacina viva atenuada que não impede a introdução da infecção em rebanhos não infectados pela aparição de animais reservatórios após vacinação (Cortes *et al.*, 2014). Vários fármacos parecem promissores na luta contra os taquizoítos, mas são necessários mais estudos para comercializar um tratamento eficaz contra a Besnoitiose bovina (Eberhard *et al.*, 2020).

5. CONCLUSÃO

O objetivo deste estudo era de caracterizar a presença da infecção por *Besnoitia besnoiti* nas explorações de leite da região Auvergne Rhône-Alpes, França. A prevalência da doença em cada departamento da região foi estudada, bem como a sua evolução ao longo dos quatro anos do período de estudo.

A prevalência da Besnoitiose bovina na região Auvergne Rhône-Alpes é mais elevada nos departamentos da Savoie (17,83%), Haute-Loire (10,94%) e Isère (10,26%) em 2022, último ano completo do período de estudo. Pode ser explicado pela localização destes departamentos, que atuam como zona tampão com outros departamentos positivos, ou de pastoreio.

O efeito conjunto do departamento e do ano de análise ($p < 0,01$), o número de animais na exploração ($p < 0,05$) e do número de análises efetuadas ($p < 0,01$) são fatores de risco significativos a tomar em consideração. As explorações mistas também parecem mais afetadas do que as explorações leiteiras.

Em estudos futuros, seria interessante avaliar a seroprevalência da doença nestas explorações estudadas, para determinar quantos animais são positivos. O estudo poderá ser adaptado a bovinos de carne, com avaliação da prevalência intra-exploração e classificação dos departamentos da região da mesma maneira. A suscetibilidade dos animais pode ser aprofundada, relativamente aos fatores de risco como a raça, estado fisiológico, idade, o género, a imunidade (recém-nascidos, vacas paridas...). A altitude e o clima, ou a presença próxima de ruminantes silvestres também poderão ser estudados enquanto fatores de risco.

Referências bibliográficas

- Álvarez-García, G. *et al.* (2013) 'A century of bovine besnoitiosis: An unknown disease re-emerging in Europe', *Trends in Parasitology*, pp. 407–415. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2013.06.002>.
- Álvarez-García, G. *et al.* (2014) 'Dynamics of *Besnoitia besnoiti* infection in cattle', in *Parasitology*. Cambridge University Press, pp. 1419–1435. <https://doi.org/10.1017/S0031182014000729>.
- Álvarez-García, Gema *et al.* (2014) 'Seroprevalence of *Besnoitia besnoiti* infection and associated risk factors in cattle from an endemic region in Europe', *Veterinary Journal*, 200(2), pp. 328–331. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.02.013>.
- Álvarez-García, G. (2016) 'From the mainland to Ireland – bovine besnoitiosis and its spread in Europe', *Veterinary Record*, 178(24), pp. 605–607. <https://doi.org/10.1136/vr.i3175>.
- Alzieu, J.-P. *et al.* (2007) *L'extension de la besnoitiose bovine en France*.
- Anastácio, C. *et al.* (2022) 'Impact of Endemic Besnoitiosis on the Performance of a Dairy Cattle Herd', *Animals*, 12(10). <https://doi.org/10.3390/ani12101291>.
- Basso, W. *et al.* (2013) 'Bovine besnoitiosis in Switzerland: Imported cases and local transmission', *Veterinary Parasitology*, 198(3–4), pp. 265–273. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.09.013>.
- Bigalke, R.D. (1968) *NEW CONCEPTS ON THE EPIDEMIOLOGICAL FEATURES OF BOVINE BESNOITIOSIS AS DETERMINED BY LABORATORY AND FIELD INVESTIGATIONS**, *Onderstepoort J. vet. Res.*
- Coelho, J. *et al.* (2023) 'Epidemiological characteristics of bovine besnoitiosis (*Besnoitia besnoiti*) in a beef cattle farm: a cross-sectional serological assessment', *Frontiers in Veterinary Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1158235>.
- Cortes, H. *et al.* (2014) 'A review on bovine besnoitiosis: A disease with economic impact in herd health management, caused by *Besnoitia besnoiti* (Franco and Borges,)', in *Parasitology*. Cambridge University Press, pp. 1406–1417. <https://doi.org/10.1017/S0031182014000262>.
- Cortes, H.C.E. *et al.* (2006) 'Isolation of *Besnoitia besnoiti* from infected cattle in Portugal', *Veterinary Parasitology*, 141(3–4), pp. 226–233. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.05.022>.
- Delooz, L. *et al.* (2021) 'Emergence of *besnoitia besnoiti* in Belgium', *Pathogens*, 10(12). <https://doi.org/10.3390/pathogens10121529>.
- Diezma-Díaz, C. *et al.* (2017) 'Bovine chronic besnoitiosis in a calf: Characterization of a novel *B. besnoiti* isolate from an unusual case report', *Veterinary Parasitology*, 247, pp. 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.09.017>.
- Dubey, J.P. *et al.* (2013) 'Development of early tissue cysts and associated pathology of *Besnoitia besnoiti* in a naturally infected bull (*Bos taurus*) from South Africa', *Journal of Parasitology*, 99(3), pp. 459–466. <https://doi.org/10.1645/12-128.1>.

Eberhard, N. *et al.* (2020) 'Activities of Endochin-Like Quinolones Against in vitro Cultured *Besnoitia besnoiti* Tachyzoites', *Frontiers in Veterinary Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00096>.

'European Food Safety Authority' (2010) *EFSA Journal*, 8(2). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1499>.

FRGDS Auvergne Rhône-Alpes (2023) *La Besnoitiose Bovine*. <https://www.frgdsaura.fr/la-besnoitiose-bovine.html#> (Accessed: 3 April 2024).

Gollnick, N.S. *et al.* (2018) 'Naturally acquired bovine besnoitiosis: Disease frequency, risk and outcome in an endemically infected beef herd', *Transboundary and Emerging Diseases*, 65(3), pp. 833–843. <https://doi.org/10.1111/tbed.12810>.

González-Barrio, D. *et al.* (2021) 'Molecular survey of *Besnoitia* spp. (Apicomplexa) in faeces from European wild mesocarnivores in Spain', *Transboundary and Emerging Diseases*, 68(6), pp. 3156–3166. <https://doi.org/10.1111/tbed.14206>.

Grisez, C. *et al.* (2020) 'Real-time PCR on skin biopsies for super-spreaders' detection in bovine besnoitiosis', *Parasites and Vectors*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04405-7>.

Gutiérrez-Expósito, D. *et al.* (2016) 'The role of wild ruminants as reservoirs of *Besnoitia besnoiti* infection in cattle', *Veterinary Parasitology*, 223, pp. 7–13. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.04.005>.

Hornok Sándor *et al.* (2014) 'Bovine besnoitiosis emerging in Central-Eastern Europe, Hungary', *Parasites & Vectors* [Preprint]. <http://www.parasitesandvectors.com/content/7/1/20> (Accessed: 1 March 2024).

ID.Vet (2023) *Rapport de validation interne ID SCREEN® BESNOITIA MILK INDIRECT*.

INSEE (2021) *Auvergne-Rhône-Alpes : Un état des lieux pour préparer demain*. Auvergne Rhône-Alpes.

Jacquet, P., Liénard, E. and Franc, M. (2010) 'Bovine besnoitiosis: Epidemiological and clinical aspects', *Veterinary Parasitology*, 174(1–2), pp. 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.08.013>.

Kiehl, E. *et al.* (2010) 'Molecular biological comparison of different *Besnoitia* species and stages from different countries', *Parasitology Research*, 106(4), pp. 889–894. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-1770-9>.

Leading Statistical Analysis Software, SAS/STAT | SAS (no date). https://www.sas.com/en_us/software/stat.html (Accessed: 12 April 2024).

Malatji, M.P., Tembe, D. and Mukaratirwa, S. (2023) 'An update on epidemiology and clinical aspects of besnoitiosis in livestock and wildlife in sub-Saharan Africa: A systematic review', *Parasite Epidemiology and Control*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.parepi.2023.e00284>.

Olias, P., Schade, B. and Mehlhorn, H. (2011) 'Molecular pathology, taxonomy and epidemiology of *Besnoitia* species (Protozoa: Sarcocystidae)', *Infection, Genetics and Evolution*, pp. 1564–1576. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.08.006>.

Pols, J.W. (1960) *STUDIES ON BOVINE BESNOITIOSIS WITH SPECIAL REFERENCE TO THE AETIOLOGY*.

Ryan, E.G. *et al.* (2016) 'Bovine besnoitiosis (*Besnoitia besnoiti*) in an Irish dairy herd', *Veterinary Record*, 178(24), p. 608. <https://doi.org/10.1136/vr.103683>.

Saegerman, C. *et al.* (2022) 'First Expert Elicitation of Knowledge on Drivers of Emergence of Bovine Besnoitiosis in Europe', *Pathogens*, 11(7). <https://doi.org/10.3390/pathogens11070753>.

Sambo, S. *et al.* (2014) 'Prevalence of *Besnoitia besnoiti* antibodies in bovine sera and milk in Northern Nigeria', *Sokoto Journal of Veterinary Sciences*, 12(1), p. 29. <https://doi.org/10.4314/sokjvs.v12i1.5>.

Schulz, K.C.A. (1960) *A REPORT ON NATURALLY ACQUIRED BESNOITIOSIS IN BOVINES WITH SPECIAL REFERENCE TO ITS PATHOLOGY*.

Villa, L. *et al.* (2019) 'Bovine besnoitiosis in an endemically infected dairy cattle herd in Italy: serological and clinical observations, risk factors, and effects on reproductive and productive performances', *Parasitology Research*, 118(12), pp. 3459–3468. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06501-9>.

Waap, H. *et al.* (2014) 'Prevalence and geographic distribution of *Besnoitia besnoiti* infection in cattle herds in Portugal', *Parasitology Research*, 113(10), pp. 3703–3711. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-4035-1>.

Waap Helga (2015) *EPIDEMIOLOGIA E DIAGNÓSTICO DA BESNOITIOSE BOVINA EM PORTUGAL*. Lisboa.

