



**Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia**

**Mestrado Integrado em Medicina Veterinária**

Dissertação

**Estudo de Prevalência de Neospora caninum em efetivos  
leiteiros da Ilha Terceira**

**Pedro Miguel Borges Faria**

Orientador(es) | Helder Cortes

João Fernandes Fagundes da Silva

Ricardo Jorge Romão

Évora 2022

---

---

---

---



**Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia**

**Mestrado Integrado em Medicina Veterinária**

Dissertação

**Estudo de Prevalência de Neospora caninum em efetivos  
leiteiros da Ilha Terceira**

**Pedro Miguel Borges Faria**

Orientador(es) | Helder Cortes  
João Fernandes Fagundes da Silva  
Ricardo Jorge Romão

Évora 2022

---

---

---

---



A dissertação foi objeto de apreciação e discussão pública pelo seguinte júri nomeado pelo Diretor da Escola de Ciências e Tecnologia:

Presidente | Rita Payan-Carreira (Universidade de Évora)

Vogais | António Castro (Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge I.P.)  
(Arguente)  
Helder Cortes (Universidade de Évora) (Orientador)

## Agradecimentos

O meu agradecimento ao Dr. Mancebo Soares e à restante direção da UNICOL, pela aquisição do kit ELISA, sem o vosso apoio não teria sido possível a realização deste estudo.

O meu obrigado ao Dr. Jorge Dinis e Dr. Vielmimo Ventura pela vossa ajuda na recolha dos sangues dos cães.

O meu agradecimento, ao Eng. Marco Barros e à Eng. Sandra Benevides, bem como aos restantes funcionários do Laboratório Regional de Veterinária, pelo seu apoio na realização dos exames serológicos.

O meu agradecimento à restante equipa da SVA: Dr. Luís Pinho, Dr. Carlos Cabral e Dr. Luís Figueiredo, Dr. Fernando Vaz e Elisabete pela sua simpatia, disponibilidade e conhecimentos.

Um agradecimento especial ao Dr. Pedro Meireles, por todos os seus ensinamentos e por me ter recebido em sua casa como parte da sua família.

À restante equipa da UNICOL: Dr. José Carlos, por todos os conhecimentos teóricos e práticos que me transmitiu ao longo dos quatro anos de estágio. Dr. Bruno Mendes, Dra. Marlene, Dr. Mário Silveira e Dr. Luís Rendeiro, por toda a sua disponibilidade, conhecimentos transmitidos e companheirismo. Ao Fábio Andrade, pelos conhecimentos de podologia transmitidos. Ao Sr. Duarte e Sr. Alberto, bem como aos técnicos e funcionários da UNICOL.

O meu eterno agradecimento ao Dr. João Fagundes, por todos os ensinamentos teóricos e práticos que me transmitiu, por todas as lições de vida. É graça a si que irei ser um ótimo veterinário, não o vou desapontar!

Obrigado ao professor Andrew Hemphill pelo entusiasmo e motivação na realização do presente trabalho e pelo apoio na revisão do resumo em inglês.

O meu agradecimento ao professor Telmo Nunes pelo seu enorme conhecimento em estatística e pela sua ajuda na elaboração desta dissertação.

À Maria João Vila-Viçosa, pela sua ajuda, disponibilidade e simpatia.

Um agradecimento especial ao Professor Hélder Cortes, pela sua ajuda incansável, disponibilidade e dedicação. Você é incrível!

Aos meus amigos por acreditarem em mim e me incentivarem a avançar com as minhas escolhas. Àqueles que me faziam querer regressar a casa e, aos que tornaram a vida muito mais fácil longe de casa.

Obrigado, Sara, por todas as trocas de apontamentos, informações e amizade.

Agradecimento em especial ao André, Rafael, Eduardo, Tiago e Ricardo, sem vocês nunca teria conseguido alcançar o que consegui. Vocês são a minha "família" de Évora, o meu obrigado por os conselhos dados, por todos os disparates e tolices que fizemos, por todas as noitadas e por todas as nossas discussões e divagações a meio das sessões de estudo. Obrigado, Manos!

À minha querida Ana Filipa, para sempre no meu coração. Obrigado por tudo!

Ao meu avô Camilo, pelo seu carinho e lições de vida.

Aos meus pais, pelo seu apoio incondicional nos momentos mais difíceis, e por terem feito todos os possíveis e impossíveis para que fosse possível alcançar este meu sonho de menino.

# Estudo de Prevalência de *Neospora caninum* em efetivos leiteiros na Ilha Terceira

## Resumo

Com o primeiro e presente estudo serológico (ELISA) para *Neospora caninum*, obteve-se uma prevalência geral de 14.83% em bovinos leiteiros, com animais positivos em 62,43% das explorações em estudo. Através de IFAT a prevalência de infeção em cães de exploração foi de 64.52%, ao passo que apenas 8.33% dos cães de áreas urbanas estavam infetados. Assim, existe um maior risco de infeção em cães de exploração comparativamente a cães ( $p=1,419 \times 10^{-9}$ ). O tipo de local de alimentação ( $p=0,01139$ ) e o tipo de infraestruturas associadas ( $p=0,006303$ ), também tiveram uma associação positiva com a presença de cães infetados por este agente. No presente trabalho, mais do que propor soluções, focamo-nos nas principais dificuldades no controlo da propagação de *N. caninum* em bovinos leiteiros na Ilha Terceira.

Palavras-chave: *Neospora caninum*, Epidemiologia, Açores, Produção Leiteira, Problemas de Controlo

# Prevalence study of *Neospora caninum* in dairy herds on Terceira Island

## Abstract

With the present – and first - serological survey (ELISA) for *Neospora caninum*, an overall prevalence of 14.83% was identified in dairy cattle, with animals in 62,43% of farms testing positive. IFAT showed that the prevalence of infected dogs living in farms was 64.52%, while only 8.33% of dogs from urban areas were infected. Thus, there is a higher risk of infection in farm dogs compared to urban dogs ( $p=1,419 \times 10^{-9}$ ). The type of feeding place ( $p=0,01139$ ) and the type of associated infrastructure ( $p=0,006303$ ), also had a positive association with the presence of dogs infected with this agent. In the present work, more than proposing solutions, we focus on the most important difficulties in controlling the spread of *N. caninum* in dairy cattle and dogs in Terceira Island.

Key-words: *Neospora caninum*, Epidemiology, Azores, Dairy Production, Control Problems

# Índice

Índice de Ilustrações .....	IV
Índice de Tabelas .....	V
Siglas e Acrónimos.....	VI
I – Casuística.....	1
1. Introdução.....	1
2. Descrição da área de Estudo .....	1
3. Atividades Desenvolvidas .....	2
II - Revisão bibliográfica sobre Neosporose Bovina .....	3
1. Introdução.....	3
1.1. Aborto em Bovinos .....	3
2. Neosporose .....	3
2.1. Introdução Histórica .....	3
2.2. Etiologia .....	5
2.3. Ciclo de Vida .....	6
2.4. Transmissão .....	13
2.5. Patogenia do aborto .....	17
2.6. Impacto Económico da Neosporose .....	27
2.7. Diagnóstico de Neosporose .....	29
2.8. Fatores de risco da neosporose bovina .....	42
2.8.1. Risco de Infecção.....	43
2.8.2. Risco de Aborto.....	50
2.9. Tratamento .....	56
2.10. Prevenção e controlo .....	58
3. Materiais e Métodos .....	63
4. Resultados.....	67
5. Discussão.....	70
6. Conclusão.....	72
Bibliografia.....	74

## Índice de Ilustrações

Figura 1. Comparação entre o aspeto dos quistos tecidulares formados por <i>N. caninum</i> e <i>T. gondii</i> . (Dubey et al. (2002)).....	5
Figura 2. Ciclo de Vida de <i>Neospora caninum</i> . Imagem adaptada de Lindsay e Dubey, (2020) .	7
Figura 3. Estados de <i>N. caninum</i> em cães e murganhos. <b>(A)</b> Oocisto não esporulado com massa central. <b>(B)</b> Oocisto esporulado com dois esporocistos (seta) e com esporozoítos (cabeça de seta). <b>(C)</b> Esfregaço de fígado de murganho sacrificado após inoculação com fezes de cão, apresentando taquizoítos individualizados (cabeça de seta) e de um taquizoíto em divisão por endodiogenia (seta). Coloração Giemsa. (McAllister et al. (1998)) .....	9
Figura 4. Marcação forte de um oocisto de <i>N. caninum</i> . IHC. 60 µm. (Kul et al., (2015)) .....	11
Figura 5. Zigoto e formas semelhantes a oocistos de <i>N. caninum</i> no epitélio ileal (seta). H&E. 100 µm. (Kul et al., (2015)).....	11
Figura 6. Marcação de esquizontes e de microgamontes semelhantes a flagelos mostrando uma fraca positividade para antigénios de <i>N. caninum</i> (ponta de seta) e uma forte marcação de esquizontes (setas). IHC. Bar, 100 µm (Kul et al., (2015)) .....	12
Figura 7. Estruturas semelhantes a esquizontes de <i>N. caninum</i> no epitélio das criptas intestinais (setas). H&E. 100 µm. Imagem inserida: Marcação forte de esquizontes no epitélio das criptas. IHC. (Kul et al., (2015)) .....	12
Figura 8. Vias de transmissão de <i>Neospora caninum</i> em bovinos. Adaptado de McAllister, (2016) .....	16
Figura 9. Quistos de <i>N. caninum</i> . (A) Quisto de parede espessa (seta) com 31 µm de diâmetro, no cérebro de um murganho inoculado com amostras de cérebro de vitelo infetado com <i>N. caninum</i> . (B) Quisto de parede espessa com 33 µm de diâmetro, no cérebro de um gerbilo. ..	31
Figura 10. Lesões tipicamente associadas à infeção por <i>N. caninum</i> encontradas em fetos bovinos. H&E. <b>(A)</b> Necrose focal e infiltrado de células mononucleares no cérebro de um feto. <b>(B)</b> Gliose, infiltrados perivasculares de células mononucleares, e neovascularização num vitelo de três dias. <b>(C)</b> Epimiocardite difusa no coração de um feto abortado. <b>(D)</b> Hepatite caracterizada por um infiltrado de células mononucleares no parênquima, em especial na área periportal. (Dubey et al., (2006)) .....	33
Figura 11. IFAT positiva para <i>Neospora caninum</i> . (McAllister, (2016)). .....	36
Figura 12. Quisto tecidular de <i>N. caninum</i> , localizado num neurónio, evidenciado por IHC com recurso a soro de coelho policlonal anti- <i>N. caninum</i> . Contramarcação com H&E (x400). (Ortega-Mora et al., (2006)) .....	41
Figura 13. Visão geral dos potenciais fatores de risco ou proteção que influenciam a transmissão horizontal ou vertical de <i>N. caninum</i> bem como a ocorrência de aborto exógeno ou endógeno associado a este. Neste diagrama, os animais naïf encontram-se com a cor cinza, os animais com infeção pós-natal estão representados a laranja e os animais infetados verticalmente encontram-se a vermelho. Adaptado de Dubey et al., (2007) .....	43
Figura 14. Diferentes níveis de abordagem quimioterápica e quimioprolática contra a neosporose em bovinos. Adaptado de Sánchez-Sánchez et al., (2018) .....	57
Figura 15. Distribuição das explorações em estudo. Vermelho – Explorações Positivas. Laranja – Explorações com cães presentes. Azul – Explorações Negativas .....	65



## Índice de Tabelas

Tabela 1. Critérios de validação do ensaio ELISA. Adaptado de CIVTEST® BOVIS NEOSPORA – HIPRA.....	66
Tabela 2. Critérios para interpretação/classificação dos resultados obtidos. Adaptado de CIVTEST® BOVIS NEOSPORA – HIPRA. ....	66
Tabela 3. Resultados da análise estatística das variáveis qualitativas. ....	68
Tabela 4. Resultados da análise estatística das variáveis quantitativas .....	69

## Siglas e Acrónimos

**ADN** – Ácido desoxirribonucleico

**BVD** – Vírus da Diarreia Viral Bovina

**CI** – Intervalo de Confiança

**cELISA** – ELISA de competição

**DO** – Densidade ótica

**ELISA** – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

**FITC** – Isotiocianato de fluoresceína

**HIV** – Vírus da Imunodeficiência Humana

**H.D.** – Hospedeiro Definitivo

**H.I.** – Hospedeiro Intermediário

**I.A.** – Inseminação Artificial

**IBR** – Vírus da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina

**ICT** - Teste imunocromatográfico rápido

**IFAP** - Instituto de Financiamento da Agricultura e Pescas

**IFAT** – Imunofluorescência indireta

**IFN** – Interferão

**Ig** – Imunoglobulina

**IHQ** - Imuno-histoquímica

**IL** – Interleucina

**IRPC** – Índice Relativo x 100 (do inglês, Relative Index Per Cent)

**LRV** - Laboratório Regional de Veterinária

**mL** – Mililitros

**mm** – milímetros

**NAT** - teste de aglutinação direta para *Neospora* spp.

**nm** – nanómetro

**nPCR** – nested-PCR

**PBS** – Solução Salina Tamponada de Fosfatos de Sódio

**PCR** – Reação em cadeia da polimerase

**Rpm** - Rotações por minuto

**SNC** – Sistema Nervoso Central

**µm** – Micrómetro

# I – Casuística

## 1. Introdução

A presente dissertação de mestrado surge no âmbito do Mestrado Integrado de Medicina Veterinária da Universidade de Évora, realizado em Clínica e Cirurgia de Espécies Pecuárias. O estágio, com duração de cinco meses, iniciou-se a quatro de outubro de 2021 e teve o seu término a quatro de março de 2022, na UNICOL – Cooperativa Agrícola, C.R.L., com sede na Ilha Terceira – Açores.

Este estágio incluiu ações de profilaxia e sanidade animal, clínica e cirurgia de bovinos leiteiros de ambulatório e acompanhamento reprodutivo de explorações de bovinos, tendo como orientador interno o Professor Hélder Cortes, e orientador externo o Dr. João Fernandes Fagundes da Silva.

A presente dissertação tem como objetivo contribuir para o conhecimento da epidemiologia de uma afeção com graves consequências na fertilidade dos bovinos: a infeção por *Neospora caninum* nos efetivos leiteiros da Ilha Terceira.

## 2. Descrição da área de Estudo

Este estágio de domínio fundamental realizou-se na UNICOL – Cooperativa Agrícola, C.R.L., sediada na Vinha Brava, no concelho de Angra do Heroísmo, na Ilha Terceira, no arquipélago dos Açores.

A UNICOL – Cooperativa Agrícola, C.R.L., trata-se de uma cooperativa, com produtores das ilhas Terceira e Graciosa, sendo o seu órgão máximo a Assembleia Geral, formada por 50 delegados e, foi constituída a 18 de Junho de 1946. Atualmente, esta cooperativa é responsável pela recolha, quase total, e transformação do leite produzido nestas duas ilhas. Engloba diversos serviços, como serviços de assistência veterinária, com uma equipa formada por seis médicos veterinários na Ilha Terceira e um médico veterinário na Ilha Graciosa, prestando serviços de clínica e cirurgia de ambulatório, profilaxia, controlo reprodutivo e aconselhamento dos produtores, inseminação artificial, podologia, recolha de leite e comercialização de produtos lácteos, fabrico de alimentos compostos para animais, comercialização de fatores de produção e de gado para abate (UNICOL – Cooperativa Agrícola, C.R.L., 2022).

Na Ilha Terceira, predominam as explorações de bovinos de aptidão leiteira, no entanto, tendo em conta o novo paradigma pelo qual muitos produtores estão a passar, o número de explorações de bovinos leiteiros encontra-se em declínio, estando a ocorrer uma conversão de muitas destas explorações em explorações de produção de bovinos de carne. Segundo dados do Instituto de Financiamento da Agricultura e Pescas (IFAP) relativos ao ano de 2021, a Região Autónoma dos Açores foi responsável pela produção de cerca de 34% de todo o leite nacional (IFAP, 2021) e, segundo os últimos dados, disponibilizados pela plataforma “Portal do Leite”, referentes ao número de produtores e total de leite entregue nas unidades industriais de laticínios dos Açores, verifica-se que o total de leite entregue, na Ilha Terceira, em 2021 foi de

cerca 153 milhões de litros, representando 24% do leite açoriano e 8% do leite nacional, produzidos por um universo de 475 produtores, no entanto este número tem vindo a diminuir em relação aos anos anteriores (856 produtores em 2011) (SRADR, 2021). Segundo dados referentes ao ano de 2014, a recolha de leite na Ilha Terceira gerou 48 milhões de euros, representando assim um dos setores mais importantes na economia terceirense (GEE, 2016).

Existem atualmente sete empresas dedicadas à transformação de leite destinado ao consumo humano, sendo a Pronicol Produtos Lácteos S.A., responsável pela marca Milhafre dos Açores, aquela que tem maior relevância, em termos de quantidade de leite recolhido e transformado (SRADR, 2021).

As explorações trabalham na sua grande maioria em regime extensivo e semi-intensivo, com efetivos médios com cerca de 40 animais, na sua maioria, em pastoreio permanente, sendo que grande parte das ordenhas são realizadas na própria pastagem, com recurso a máquinas de ordenha móveis, e em apenas cerca de 20% das explorações a ordenha é feita numa sala de ordenha.

A pastagem é a base da alimentação, suplementando-se, em alturas de menor abundância, com alimentos compostos complementares e silagem de erva e/ou de milho.

Segundo dados dos últimos censos, realizados em 2021, na Região Autónoma dos Açores existem 246.772 habitantes (SREA, 2021), em relação ao efetivo bovino, existem 283 mil bovinos nos Açores (cerca de 66 mil presentes na Ilha Terceira) (DRAAC, 2021; INE, 2021), dos quais cerca de 95 mil são de aptidão leiteira (cerca de 24 mil bovinos leiteiros na Ilha Terceira) (DRAAC, 2021; SRADR, 2021), já na Ilha Terceira, existem 56.437 habitantes (35.402 no concelho de Angra do Heroísmo e 21.035 no concelho da Praia da Vitória) (SREA, 2021).

### 3. Atividades Desenvolvidas

Durante o estágio, acompanhei o Dr. João Fagundes no decorrer das suas atividades e tarefas, tendo sido desenvolvidas diversas ações de profilaxia médico-veterinária de algumas doenças infecciosas (clostridioses, doença respiratória bovina, IBR e BVD) através da vacinação de vitelos e da sua desparasitação, também se realizaram diagnósticos de gestação e de afeções do aparelho reprodutor, nos dias destinados ao acompanhamento reprodutivo, a quatro explorações de bovinos leiteiros e uma de carne, em horário combinado com os produtores, de forma rotineira, e de forma esporádica a outras explorações, cujo produtor solicitava os serviços de acompanhamento reprodutivo, com recurso ao ecógrafo Easi-Scan:Go, da IMV Imaging©.

Pude acompanhar, o Dr. João Fagundes, e participar ativamente no serviço de clínica e cirurgia de bovinos em ambulatório, de acordo com a escala de serviço estipulada durante a semana, e também, mas de forma rotatória, durante os fins de semana. Tendo observado maioritariamente afeções do sistema respiratório (complexo respiratório bovino) e digestivo (diarreias neonatais) em vitelos, em relação aos bovinos adultos observaram-se principalmente problemas metabólicos (hipocalcemia e cetose), afeções respiratórias (broncopneumonias), partos distócicos e, por fim, problemas digestivos (indigestões e deslocamento de abomaso).

Por fim, também pude acompanhar e ajudar, nos dias de folga semanal, o podólogo Fábio Andrade, responsável pelo serviço de podologia da UNICOL – Cooperativa Agrícola, C.R.L., no tratamento das afeções podais existentes nas explorações, bem como na aparagem corretiva dos cascos, através de agendamento prévio com os produtores.

Durante as atividades desenvolvidas com o Dr. João Fagundes, nas 40 explorações previamente selecionadas de forma aleatória para o desenvolvimento desta dissertação, procedeu-se à recolha de sangue de dez bovinos de forma aleatória, para tubos sem anticoagulante, procedendo-se à entrega destas amostras biológicas no Laboratório Regional de Veterinária (LRV) para posterior análise. Após a conclusão das recolhas de sangue dos bovinos, procedeu-se à recolha de sangue dos cães presentes em 20 das 40 explorações selecionadas, também para tubos sem anticoagulante, tendo os mesmos sido centrifugados, após coagulação, e seguidamente congelados.

## II - Revisão bibliográfica sobre Neosporose Bovina

### 1. Introdução

#### 1.1. Aborto em Bovinos

O aborto em bovinos é definido de diferentes formas quer na literatura quer por médicos veterinários e produtores, no entanto, por consenso científico, deve definir-se aborto em bovinos como a expulsão de um feto entre o período a partir do qual ocorre a diferenciação completa (dia 42) e entre o limite em que este não é capaz de ter uma vida independente (dia 260) (New York State College of Veterinary Medicine, 1911; Mee, 2020).

Quer o aborto, quer a mortalidade embrionária, são acontecimentos responsáveis por provocar grandes prejuízos económicos nas explorações leiteiras, seja pela perda direta de uma gestação e conseqüente aumento do intervalo entre partos, seja pelo atraso e aumento da idade ao primeiro parto das novilhas de reposição, afetando assim de forma negativa todos os índices de produtividade dos efetivos (De Vries, 2006; Albuja et al., 2019). Segundo López-Gatius et al., (2004), o aborto, para os produtores de leite, é provavelmente o problema reprodutivo com maior importância, em especial se este ocorrer entre os 30 e 90 dias de gestação (López-Gatius et al., 2004b).

## 2. Neosporose

### 2.1. Introdução Histórica

A neosporose é uma doença causada por *Neospora caninum*, um protozoário, parasita intracelular obrigatório (García-Sánchez et al., 2020), muito semelhante estruturalmente com *Toxoplasma gondii* (Dubey et al., 1988a; Pitel et al., 2001). Esta similaridade estrutural, dificultou a sua diferenciação, tendo apenas sido caracterizado em 1988 por Dubey et al. (1988a) (Dubey et al., 1988a; Lindsay e Dubey, 2020). No entanto, esta doença e a sua apresentação clínica já fora observada e descrita, pela primeira vez, em cães infetados congenitamente, com encefalomielite grave e que não apresentavam anticorpos contra *Toxoplasma gondii*, na Noruega

em 1984 (Bjerkås et al., 1984). Foi graças à descrição deste caso que foi possível obter-se a caracterização detalhada deste parasita e a sua designação atual de *Neospora caninum*, deixando de se confundir com *T. gondii*, devido ao trabalho de Dubey et al. (1988a), que procederam à análise retrospectiva de cortes histológicos e das apresentações clínicas de 23 cães, cujo diagnóstico final tinha sido toxoplasmose. De facto, identificaram o parasita *T. gondii* em 13 cães, mas nos restantes dez cães foi identificado o parasita que Dubey entendeu denominar por *Neospora caninum*. Os autores chegaram então à conclusão de que este último parasita apresentava uma estrutura diferente de *T. gondii*, e a inexistência de reação serológica cruzada entre os dois. Apesar de terem uma apresentação clínica semelhante, a neosporose é caracterizada por afeções neurológicas e de miosite mais graves, relativamente à toxoplasmose, o que coincidiu com os achados histológicos (Dubey et al., 1988a). Dubey et al. (1988a), observaram que os quistos de *Neospora caninum* encontravam-se no citoplasma celular, apresentando bradizoítos com inúmeras róptrias (ao contrário de *T. gondii* que apresentam poucas róptrias). Com estes trabalhos, os autores concluíram que estavam na presença de um novo género e espécie (Dubey et al., 1988a), o qual no presente é a mais importante causa de prejuízo em explorações de bovinos de leite de origem parasitária (Dubey, 1999; Hemphill e Gottstein, 2000).

Este parasita foi isolado a partir de uma cultura celular proveniente de cachorros infetados congenitamente, que embora tivessem nascido saudáveis, desenvolveram paresia dos membros posteriores, entre as cinco e oito semanas de vida. Tendo-se verificado que as lesões consistiam predominantemente em poliradiculoneurite e polimiosite granulomatosa (Dubey et al., 1988b). Este isolamento permitiu então a obtenção de antigénio para ser utilizado em testes imunológicos (Dubey et al., 1988b) e imunohistoquímicos (Lindsay e Dubey, 1989a). Com a disseminação do conhecimento e das técnicas utilizadas para diagnóstico, em poucos anos tornou-se evidente que a neosporose trata-se de uma importante causa de aborto e mortalidade neonatal em bovinos, em todo o mundo (Dubey e Lindsay, 1996; Dubey et al., 2007, 2017; Lindsay e Dubey, 2020).

A primeira descrição de *Neospora caninum* em Portugal ocorreu em 2001 (Thompson et al., 2001), e o primeiro isolado, a partir do tecido cerebral de um feto abortado com quatro meses, em 2002, oriundo de uma vacaria de leite no Porto (Canada et al., 2002b).

## 2.2. Etiologia

*Neospora caninum* é um parasita protozoário intracelular (García-Sánchez et al., 2020), pertencente ao Filo Apicomplexa, Classe Sporozoa, Subclasse Coccidia, Ordem Eucoccidiorida, Família *Sarcocystidae* e Gênero *Neospora* (Ellis et al., 1994; McAllister et al., 1998a; Goodswen et al., 2013). *N. caninum* é um protozoário muito semelhante estruturalmente com *T. gondii* (Dubey et al., 1988a), no entanto, tendo por base este estudo, Dubey et al. (2002) distingue a infecção por *N. caninum* de *T. gondii*, relacionando a apresentação clínica dos animais (a paresia dos membros posteriores é apenas verificada em animais com neosporose), o aspeto morfológico dos quistos tecidulares [ao contrário dos quistos de *T. gondii*, que têm as paredes do vacúolo parasitóforo muito finas (<0.5  $\mu\text{m}$ ), os quistos de *N. caninum* têm as paredes do vacúolo parasitóforo muito mais espessas, 1-4  $\mu\text{m}$ ] (Fig. 1), a nível serológico e imunohistoquímico (os animais não possuíam anticorpos anti-*T. gondii* e, nas análises imunohistoquímicas não ocorria reação aos anticorpos para *T. gondii*) (Dubey et al., 2002a).

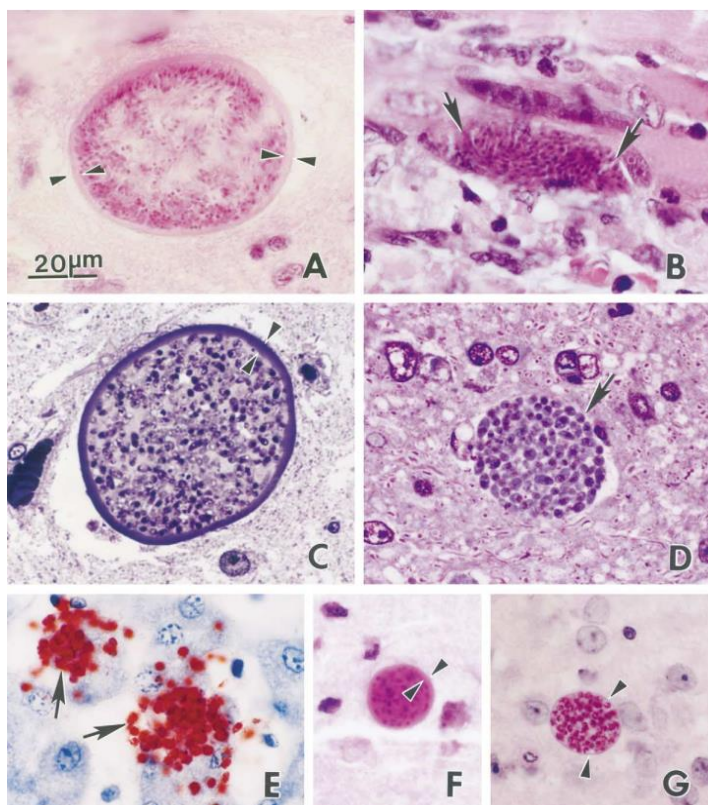


Figura 1. Comparação entre o aspeto dos quistos tecidulares formados por *N. caninum* e *T. gondii*. (Dubey et al. (2002))

Atualmente, *N. caninum* é considerado um dos principais agentes causadores de aborto em bovinos, a nível mundial (McAllister et al., 1998a; Pitel et al., 2001; Dubey et al., 2006, 2007; Almería et al., 2009; de Oliveira et al., 2010; Lindsay e Dubey, 2020). Este parasita, além de provocar abortos em bovinos, casualmente pode causar aborto em pequenos ruminantes (ovinos e caprinos) (Lindsay et al., 1995; Kobayashi et al., 2001; Koyama et al., 2001), veados (Gondim et al., 2004b), rinocerontes, alpacas e lamas (Dubey et al., 2002a; Dubey, 2003; Dubey et al.,

2006) é também responsável por provocar doença grave em cães (Dubey e Lindsay, 1996; Dubey et al., 2006). Estudos recentes comprovaram a infecção por *Neospora caninum* em porcos na China (Gui et al., 2020).

Outra espécie, sugerida por Marsh et al. (1998) após inoculação de uma cultura de células em tecido cerebral de um cavalo, *Neospora hughesi*, com base em diferenças relativamente a proteínas, perfis da região ITS1, e morfologia dos quistos tecidulares, é responsável por afetar equinos (Marsh et al., 1998; Dubey et al., 2002a), causando problemas neurológicos associados à encefalite causada e mortalidade neonatal (Dubey et al., 2001b).

Além das espécies referidas acima, já foram encontrados anticorpos contra *N. caninum* em roedores (ratos) e lagomorfos (coelhos) (Almería, 2013), guaxinins, camelos, porcos, gatos (Dubey e Lindsay, 1989a, 1989b), raposas (Almería et al., 2002), coiotes e outros animais silvestres (Dubey, 2003; Dubey et al., 2007; Almería, 2013), além destes também foram encontrados anticorpos em mamíferos aquáticos, como morsas, focas, golfinhos, leões-marinhos e lontras (Dubey et al., 2003).

Apesar de existirem relatos da presença de anticorpos contra *N. caninum*, sugerindo infecção ou exposição, nunca se conseguiu encontrar vestígios do parasita em tecidos humanos (Tranas et al., 1999; Lobato et al., 2006; Duarte et al., 2020), no entanto encontram-se descritas infecções experimentais em macacos-rhesus (*Macaca mulatta*) em que os taquizoítos atravessaram a placenta e infetaram o feto (Barr et al., 1994; Dubey et al., 2017), causando incerteza acerca do potencial zoonótico deste parasita (Dubey et al., 2007) e dos seus efeitos sobre a gestação de humanos (Duarte et al., 2020), uma vez que num estudo, realizado *in vitro*, verificou-se a infecção de células trofoblásticas humanas e de células HeLa por *N. caninum* (Carvalho et al., 2010).

Mais recentemente, num estudo desenvolvido por Oshiro et al., (2015), os autores encontraram anticorpos anti-*N. caninum* em pacientes com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), sugerindo que humanos imunocomprometidos poderão ficar infetados, de forma oportunista, com *N. caninum* da mesma forma que se infetam com *T. gondii*, ou seja pelo consumo acidental de oocistos esporulados eliminados nas fezes de cães, e pelo consumo de carne crua ou mal processada termicamente com quistos tecidulares dos H.I. (McCann et al., 2008).

### 2.3. Ciclo de Vida

O ciclo de vida deste parasita é heteroxeno, ou seja, são necessários dois hospedeiros para que o seu ciclo de vida se complete (Dubey et al., 2006). Os cães (*canis lupus familiaris*) (McAllister et al., 1998a) e outros canídeos como os coiotes (*canis latrans*) (Gondim et al., 2004c), os lobos (*canis lupus*) (Dubey et al., 2011; Donahoe et al., 2015) e os dingos (*canis lupus dingo*) (King et al., 2010) são reconhecidos como hospedeiros definitivos (H.D.) de *N. caninum*, nos quais ocorre a fase sexuada do ciclo de vida deste parasita (Khan et al., 2020). Em relação aos hospedeiros intermediários (H.I.), os bovinos são a principal espécie afetada (Dubey et al., 2007),



no entanto este parasita apresenta uma grande variedade de H.I como, por exemplo, herbívoros como os ovinos (Kobayashi et al., 2001; Koyama et al., 2001; Dubey et al., 2002a), caprinos (Lindsay et al., 1995), equinos (Lindsay et al., 1996; Bartova et al., 2015), búfalos (Neverauskas et al., 2015), e outros mamíferos, como os suínos (Gui et al., 2020), felinos (Dubey e Lindsay, 1989a; Dubey et al., 2002b), raposas (Almería et al., 2002), roedores (ratos, gerbilos, porquinhos-da-índia) (Lindsay e Dubey, 1990; McAllister et al., 1998a; Dubey e Lindsay, 2000; Schares et al., 2001a), lamas e alpacas (Dubey e Schares, 2011; King et al., 2015), corvos (Salant et al., 2015), galinhas (Costa et al., 2008), pombos (Du et al., 2015; de Barros et al., 2018), rinocerontes, diversas espécies de veados, algumas espécies de mamíferos aquáticos (focas e lontras) (Dubey e Schares, 2011; Almería, 2013; Donahoe et al., 2015; Liu et al., 2015).

Os cães e outros canídeos silvestres, como os lobos e coiotes, além de serem H.D. de *N. caninum*, são também H.I. deste parasita (Gondim et al., 2004c; Dubey et al., 2007; Dubey e Schares, 2011; Dubey et al., 2011; Almería, 2013; Donahoe et al., 2015).

O ciclo de vida de *N. caninum* (Fig. 2) é marcado por três estados infecciosos: taquizoítos, em constante divisão, quistos tecidulares com bradizoítos, em crescimento lento, e oocistos com esporozoítos (Dubey et al., 2007, 2006; Silva e Machado, 2016).

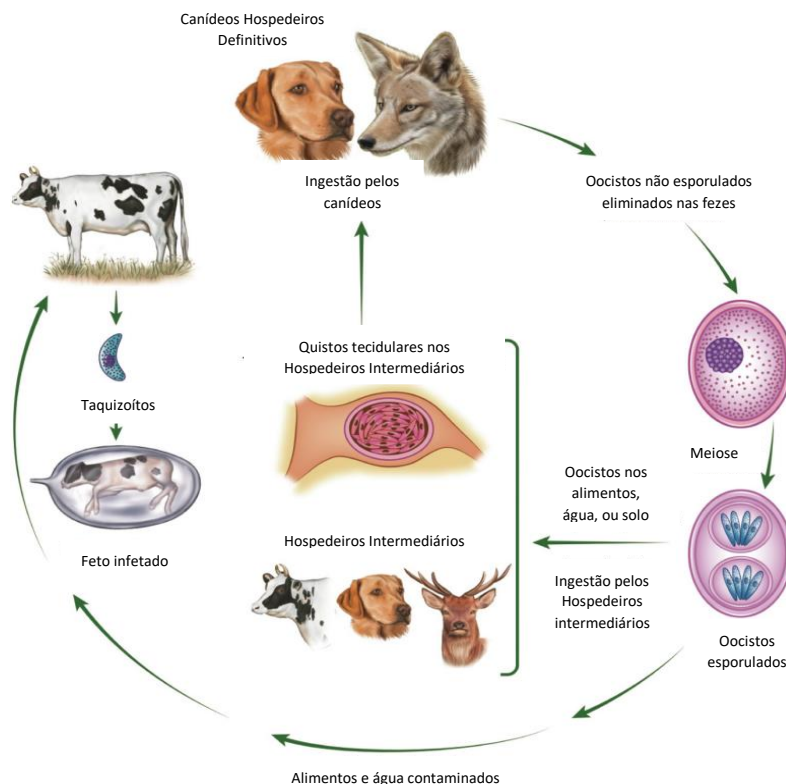


Figura 2. Ciclo de Vida de *Neospora caninum*. Imagem adaptada de Lindsay e Dubey, (2020)

Os taquizoítos e os quistos tecidulares são os dois estados encontrados nos H.I. e HD, que ocorrem intracelularmente (Dubey et al., 2002a). Os taquizoítos consistem numa forma de multiplicação rápida das células haploides, responsável alterações deletérias dos tecidos, destruindo as células hospedeiras, permitindo assim a sua célere propagação, movendo-se entre

as células hospedeiras ou por via sanguínea, disseminando a infecção pelo organismo do hospedeiro, e de forma transplacentária infectando o feto (Gottstein e Conraths, 2007). Estas formas de desenvolvimento rápido apresentam um aspeto semilunar, medem aproximadamente 6 x 2 µm, com um núcleo central mas, ao contrário dos bradizoítos, não possuem grânulos de amilopectina, dividem-se rapidamente de forma assexuada no espaço intracelular, no interior de um vacúolo parasitóforo, por uma espécie de divisão binária chamada de endodiogenia (Sykes, 2014; Khan et al., 2020), podendo infectar o útero, no caso do animal estar gestante (Dubey et al., 2006) e células nucleadas dos tecidos nervoso, endotelial, muscular, hepático, renal, macrófagos alveolares, e trofoblasto no placenta, o que sugere uma baixa especificidade celular (Hemphill et al., 1999; Speer et al., 1999), causando a sua lise, devido à grande expansão do vacúolo parasitóforo, e permitindo a saída de novos taquizoítos e invasão de outras células, ativando os mecanismos de resposta inata e adaptativa do sistema imune do hospedeiro. Face à ação conjugada do sistema imune do hospedeiro, os taquizoítos irão converter-se em bradizoítos, ou seja, convertem-se num tipo de células com multiplicação lenta, com um diferente metabolismo e expressão antigénica, formando uma parede quística intracelular, em seu redor, que protege as formas parasitárias do sistema imune e de fármacos (Barr et al., 1991a; Dubey et al., 2002a; Khan et al., 2020; Lindsay e Dubey, 2020).

Os quistos tecidulares consistem numa forma de latência do parasita, que se encontram no interior de vacúolos parasitóforos de paredes espessas originados a partir da membrana plasmática da célula hospedeira e são encontrados nos tecidos dos H.I. e H.D. (Dubey et al., 2017, 1988a, 1988b). Estes quistos tecidulares são encontrados frequentemente nos tecidos do sistema nervoso central (Dubey e Lindsay, 1996; Dubey et al., 2007), no entanto também podem ser encontrados em tecidos extraneurais, em especial no tecido muscular (Peters et al., 2001; Dubey et al., 2004), e noutros órgãos como fígado, coração e pulmões, podendo persistir muitos anos de forma assintomática (Dubey e Lindsay, 1996; Collantes-Fernández et al., 2006; Dubey et al., 2017; Jiménez-Pelayo et al., 2019) mas, em caso de imunodepressão do hospedeiro, pode ocorrer a recrudescência da doença através da conversão dos bradizoítos em taquizoítos, causando a rotura dos quistos tecidulares dispersando a infecção (Dubey, 1999; Wouda et al., 1999b; Hemphill et al., 2006). Este processo encontra-se bem descrito em animais gestantes, levando à infecção fetal (Quinn et al., 2002; Williams et al., 2009; Sykes, 2014). Os quistos de *N. caninum* têm uma forma esférica ou oval até 107 µm de comprimento, e podem conter até 100 bradizoítos multiplicando-se lentamente, apresentam uma parede singular e lisa, mas espessa podendo atingir os 4 µm. Tipicamente, os quistos tecidulares, em bovinos, apresentam um tamanho pequeno, entre 5-50 µm de diâmetro, com a espessura da parede a variar entre <1 a 2,5 µm, sendo a espessura da parede independente do tamanho do quisto (Dubey et al., 2002a). Os bradizoítos, no interior dos quistos, medem aproximadamente 7 a 8 x 2 µm, apresentam um núcleo em posição terminal, e contêm alguns grânulos de amilopectina, que com a coloração de ácido periódico-Schiff (PAS) coram de vermelho (Dubey et al., 2004), conseguem sobreviver à

temperatura de 4°C até 14 dias (Lindsay et al., 1999a; Speer et al., 1999; Dubey et al., 2002a) e são também resistentes à ação da pepsina e tripsina (Silva e Machado, 2016).

Pensa-se que os bradizoítos são responsáveis pelas fases de reprodução sexuada e assexuada nos intestinos dos canídeos, culminando na formação de oocistos que acabam por ser eliminados nas fezes (Dubey et al., 2004; Lindsay e Dubey, 2020), no entanto ainda é desconhecido o local onde ocorrem as fases de reprodução sexuada, esquizogonia e gametogonia. A única forma sexuada de *N. caninum* conhecida, até hoje, é o oocisto diploide não esporulado (Khan et al., 2020).

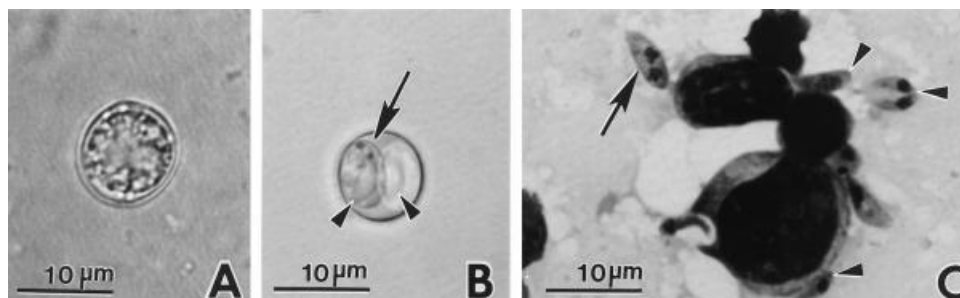


Figura 3. Estados de *N. caninum* em cães e murganhos. **(A)** Oocisto não esporulado com massa central. **(B)** Oocisto esporulado com dois esporocistos (seta) e com esporozoítos (cabeça de seta). **(C)** Esfregaço de fígado de murganho sacrificado após inoculação com fezes de cão, apresentando taquizoítos individualizados (cabeça de seta) e de um taquizoíto em divisão por endodiogenia (seta). Coloração Giemsa. (McAllister et al. (1998))

Os oocistos não esporulados de *N. caninum* (Fig. 3) são excretados nas fezes, pelos seus H.D., como os cães, lobos e coiotes, para o ambiente sendo esta uma forma de resistência às condições ambientais, podendo sobreviver por vários meses ou até anos (McAllister et al., 1998a; Lindsay et al., 1999a; Gondim et al., 2004c; Silva e Machado, 2016), a sua esporulação ocorre, fora do seu H.D., no ambiente. Os oocistos usualmente apresentam uma forma esférica a semiesférica com um diâmetro entre os 10 e 12 µm, contendo um esporonte central (Dubey et al., 2002a) e, regra geral, em condições ambientais demoram sensivelmente 24 horas a esporular (Lindsay et al., 1999a) podendo ir até às 72 horas após eliminação com as fezes (Sykes, 2014; Shaapan, 2016). A parede dos oocistos é lisa e sem coloração, apresentando uma espessura de 0,6-0,8 µm, é responsável por envolver os dois esporocistos haploides obtidos por meiose durante o processo de esporulação (Dubey et al., 2017, 2002a). Cada oocisto contém dois esporocistos, cada um com quatro esporozoítos, de forma alongada com um núcleo em posição central ou ligeiramente posterior, medindo, individualmente, 6,5 x 2 µm (McAllister et al., 1998a; Lindsay et al., 1999b). Após a esporulação, os oocistos tornam-se capazes de infectar os H.I. e H.D. (Rosypal e Lindsay, 2005), no entanto as fases entero-epiteliais deste parasita, no intestino dos hospedeiros definitivos, ainda não foram devidamente identificadas (Dubey et al., 2002a). No entanto, já foram observadas várias estruturas semelhantes a esquizontes e oocistos na mucosa e vilosidades intestinais, apesar de a reação serológica com estas estruturas, não ter sido completamente esclarecedora (Kul et al., 2015).

Atualmente pouco se sabe acerca da resistência dos oocistos de *N. caninum* no ambiente, ainda assim é possível assumir que devido à robustez da sua parede, sejam resistentes à congelação e dessecação, sendo assim capazes de sobreviver às condições ambientais (Goodswen et al., 2013; Dubey et al., 2017), de forma semelhante aos oocistos de *T. gondii* (Dubey, 2004a; Dubey et al., 2007; Jones e Dubey, 2010).

Segundo Dubey et al., (2007), e Shaapan, (2016), nos carnívoros hospedeiros definitivos, a transmissão horizontal dá-se através da ingestão de tecidos infetados com quistos tecidulares, contendo bradizoítos, provenientes dos H.I., tais como membranas fetais (placenta), fetos abortados (Dijkstra et al., 2001b), tecido neuronal ou outros tecidos infetados dos bovinos (Gondim et al., 2002) como o músculo cardíaco, tecido hepático, músculos masséters, comprovados por Cavalcante et al., (2011), mas não pela ingestão de leite ou colostro de vacas infetadas (Davison et al., 2001; Dijkstra et al., 2001b). Estes carnívoros também se podem parasitar com a ingestão de alimentos ou água contaminada com oocistos esporulados (Dubey et al., 2007, 2006). Alternativamente, num estudo realizado por Schares et al., (2005), os autores verificaram que cães, cujos donos afirmaram que não comeram tecidos de bovino, nem tecidos de outro H.I. de *N. caninum*, tinham eliminado oocistos nas fezes, colocando-se a hipótese de a coprofagia poder ser uma forma de disseminação de oocistos pelo ambiente. Além da transmissão horizontal, também pode ocorrer transmissão vertical nos cães, diversos estudos provaram a transmissão de *N. caninum* através de cadelas infetadas subclínicamente à sua descendência em ninhadas sucessivas, ainda assim a infeção transplacentária não apresenta grande relevância na manutenção da infeção em populações caninas (Dubey e Lindsay, 1989c; Cole et al., 1995; Barber e Trees, 1996; Dubey, 2003; Dubey et al., 2005, 2006, 2007; Heckerroth e Tenter, 2007; Reichel et al., 2007; Dubey e Schares, 2011; Goodswen et al., 2013).

Hospedeiros intermediários, como os bovinos, podem infetar-se através da ingestão de pastagem, água ou qualquer outro tipo de alimento contaminado com oocistos esporulados de *N. caninum*. Após a ingestão dos oocistos esporulados inicia-se o processo de desenquistamento, no qual os esporozoítos são libertados no lúmen intestinal. Posteriormente ocorre a invasão do epitélio intestinal e a conversão dos esporozoítos em taquizoítos, a nível intracelular num vacúolo parasitóforo, replicando-se rapidamente por endodiogenia (Goodswen et al., 2013) conduzindo ao rebentamento das células infetadas. Pensa-se que esta fase ocorre nos linfonodos mesentéricos (Dubey et al., 2006) o que permitirá a disseminação deste agente parasitário, por via sanguínea, pelo organismo do H.I., infetando o útero, no caso do animal estar gestante (Dubey et al., 2006), e diferentes tipos de células (Barr et al., 1993; Dubey et al., 2002a), referidas anteriormente. Após esta disseminação dos taquizoítos dá-se a sua conversão em bradizoítos, em resposta aos mecanismos de defesa do H.I., formando quistos tecidulares ficando assim protegidos da resposta imune do H.I. (Barr et al., 1991a; Dubey et al., 2002a; Miller et al., 2009; Khan et al., 2020; Lindsay e Dubey, 2020).

O ciclo de vida deste parasita fica concluído quando os quistos tecidulares, por exemplo presentes em carne contaminada, são ingeridos por um canídeo (McAllister et al., 1998a). Estes

quistos conseguem sobreviver à passagem pelo estômago, uma vez que são resistentes à ação da pepsina e tripsina (Silva e Machado, 2016), mas ao chegar ao intestino delgado ocorre a sua libertação e acabam por infectar as células do epitélio intestinal. As fases entero-epiteliais, de esquizogonia e gametogonia, deste protozoário ainda não foram completamente clarificadas mas, como referido anteriormente, presume-se que antecedam a fase diploide, formação dos oocistos, contendo esporozoítos (Dubey et al., 2004; Hemphill et al., 2009), recomeçando o seu ciclo de vida (Goodswen et al., 2013), tendo sido demonstrado, por diversos autores, que cães alimentados com carne de diferentes H.I. infetada com taquizoítos ou quistos tecidulares (contendo bradizoítos), podem eliminar até milhões de oocistos (McAllister et al., 1998a; Lindsay et al., 1999a, 2001; Schares et al., 2001b; Gondim et al., 2002; Dubey et al., 2007; Silva e Machado, 2016).

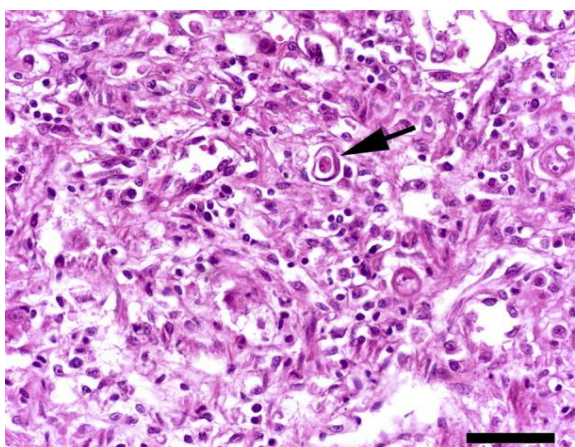


Figura 5. Zigoto e formas semelhantes a oocistos de *N. caninum* no epitélio ileal (seta). H&E. 100  $\mu$ m. (Kul et al., (2015))

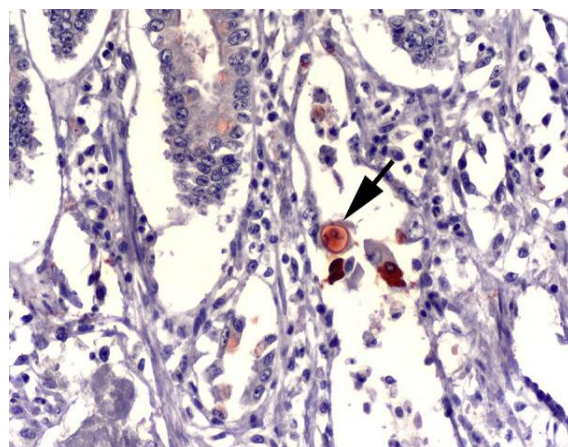


Figura 4. Marcação forte de um oocisto de *N. caninum*. IHC. 60  $\mu$ m. (Kul et al., (2015))

No entanto, mais recentemente, Kul et al., (2015) observaram a presença de numerosas estruturas semelhantes a esquizontes e oocistos na mucosa intestinal e epitélio das criptas (Fig. 4 e 5), além de que, em algumas áreas, o epitélio das criptas continha estruturas granulares 10 a 15  $\mu$ m, no lado apical das células (Fig. 6). Estas estruturas semelhantes a esquizontes, a nível imuno-histoquímico, apresentavam grande afinidade aos antígenos de *N. caninum*, adicionalmente, também se observaram numerosas fases de desenvolvimento características dos esquizontes num interior de áreas de necrose e criptas quísticas (Fig. 6). Os autores também verificaram a presença de estruturas, com baixa afinidade aos antígenos de *N. caninum*, semelhantes a microgamontes com o aspeto de pequenos pontos com estruturas semelhantes a flagelos (Fig. 7). Também foi observada a presença de oocistos intracelulares tendo mostrado uma imunopositividade fraca a *N. caninum*, no entanto não foi encontrada qualquer presença antigénica de *N. caninum* nos tecidos intersticiais, apenas em neurónios degenerados e em focos de necrose a nível pulmonar e cardíaco (Kul et al., 2015).

Presentemente, é reconhecida a existência de um ciclo de transmissão deste parasita em meios rurais, entre cães e bovinos, uma vez que num estudo realizado por Antony e Williamson, (2003), na Nova Zelândia, verificou-se que a seroprevalência de anticorpos anti-*N.*

*caninum* nos cães dos meios rurais era expressivamente mais elevada, quando comparados com cães urbanos.

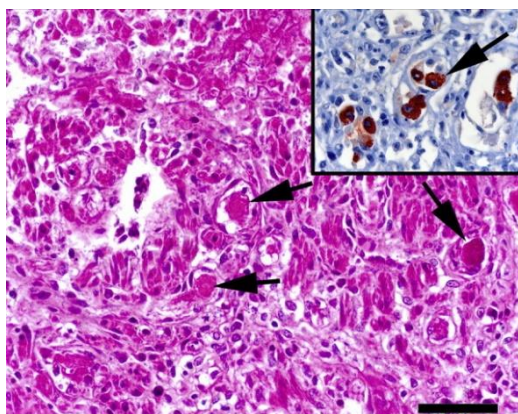


Figura 7. Estruturas semelhantes a esquizontes de *N. caninum* no epitélio das criptas intestinais (setas). H&E. 100 µm. Imagem inserida: Marcação forte de esquizontes no epitélio das criptas. IHC. (Kul et al., (2015))

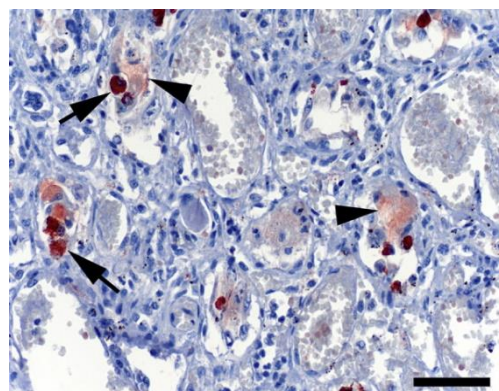


Figura 6. Marcação de esquizontes e de microgamontes semelhantes a flagelos mostrando uma fraca positividade para antígenos de *N. caninum* (ponta de seta) e uma forte marcação de esquizontes (setas). IHC. Bar, 100 µm (Kul et al., (2015))

A existência de coiotes e de outros canídeos silvestres pode vir a desempenhar um papel importante naquilo que é o ciclo de vida silvático de *N. caninum*, juntamente com o facto dos veados serem um H.I. deste parasita. Assim sendo, coloca-se a hipótese da ocorrência de infecção por *N. caninum* entre animais silvestres e animais domésticos (Gondim et al., 2004b; Almería, 2013). A ocorrência de caçadas, promovidas pelo Homem, favorece a transmissão deste parasita dos veados para os canídeos, uma vez que as carcaças destes são comumente evisceradas no campo. Por sua vez, a infecção dos canídeos aumenta o risco da transmissão deste protozoário aos animais domésticos (Gondim et al., 2004c).

### 2.3.1. Eliminação de oocistos pelos cães e outros hospedeiros definitivos

Os oocistos são um aspeto muito importante da epidemiologia da neosporose, no entanto ainda pouco se sabe acerca da sua biologia (Dubey et al., 2007). Diversos autores verificaram que os cães começam a eliminar oocistos cinco ou mais dias após a ingestão de tecidos (incluindo tecido neuronal, muscular, vísceras e membranas fetais) de animais infetados naturalmente ou experimentalmente (McAllister et al., 1998a; Lindsay et al., 1999a, 2001; Schares et al., 2001b; Gondim et al., 2002), contudo ainda pouco se sabe acerca da frequência de eliminação de oocistos por parte de cães cronicamente infetados e se a eliminação ocorre mais do que uma vez ao longo da sua vida (Dubey, 2003), uma vez que num estudo feito por Dijkstra et al., (2001b), verificou-se que dois cães, já infetados por *N. caninum*, não eliminaram mais oocistos após nova exposição a este agente, pelo consumo de placentas infetadas. No entanto, ainda é necessária a confirmação destas observações em trabalhos com maior número de cães (e possivelmente canídeos silvestres) e com diferentes tipos de tecidos infetados tendo diferentes quantidades de *N. caninum*. O recrudescimento da eliminação de oocistos pelas fezes

também necessita de mais estudos, de modo a determinar a possibilidade da ocorrência deste fenómeno em determinadas circunstâncias (ex. gestação) e diferentes níveis de stress (Haddad et al., 2005). A duração total do tempo em que os hospedeiros definitivos eliminam oocistos nas fezes, após a infeção primária, varia desde um a vários dias, geralmente por um período inferior a duas semanas (McAllister, 2016). O número total de oocistos eliminados, o período pré-patente, e a duração do período em que ocorre a eliminação dos oocistos varia tremendamente. Os fatores que afetam a excreção de oocistos ainda são desconhecidos e a sua investigação é difícil, devido aos custos associados no alojamento dos cães em instalações apropriadas para a realização dos estudos, além de que pode ocorrer a eliminação de uma pequena quantidade de oocistos e porque a eliminação de oocistos é errática. Aparentemente, os cães eliminam mais oocistos após a ingestão de tecidos de bovinos infetados do que após a ingestão de tecidos de roedores (Gondim et al., 2002), e também se verificou que cachorros eliminam mais oocistos que os cães adultos (Gondim et al., 2005). Noutros dois estudos, verificou-se que alguns dos cães, em que se administrou corticosteroides em doses imunossupressoras, eliminaram mais de 100 mil oocistos após a ingestão de cérebro de roedores, sugerindo que animais imunodeprimidos eliminam maior quantidade de oocistos quando comparados a animais imunocompetentes (Lindsay et al., 2001, 1999a). Schares et al., (2005) observaram o maior número de oocistos eliminados por um cão infetado naturalmente (400 mil oocistos), este cão tinha sido esplenectomizado sete semanas antes do estudo.

Atualmente, existem poucos relatos da eliminação de oocistos de *N. caninum* em cães infetados naturalmente (Basso et al., 2001a; Slapeta et al., 2002; McGarry et al., 2003; Schares et al., 2005; McInnes et al., 2006).

## 2.4. Transmissão

A transmissão de *N. caninum* para um animal não infetado pode ocorrer de duas formas, por via horizontal ou por via vertical, podendo ser chamada de transplacentária ou congénita (Monney e Hemphill, 2014), sendo ambas importantes para a sobrevivência e manutenção deste parasita (Dubey et al., 2006).

A forma como os cães adquirem a infeção por *N. caninum* na natureza ainda não foi totalmente elucidada (Dubey et al., 2007; Dubey e Schares, 2011). Historicamente, a transmissão vertical deste parasita foi reconhecida pela primeira vez em cães, em 1984 (Bjerkås et al., 1984). A transmissão transplacentária foi demonstrada em cães infetados experimentalmente (Dubey e Lindsay, 1989c; Cole et al., 1995). Na maior parte dos casos de neosporose neonatal, os sinais clínicos são ligeiros depois das cinco a sete semanas após o nascimento (Dubey e Lindsay, 1996), estes dados obtidos sugerem que *N. caninum* é transmitido da progenitora para os descendentes durante as fases finais da gestação ou por via lactogénica, após o nascimento (Dubey et al., 2007; Dubey e Schares, 2011). De acordo com Barber e Trees, (1998), a transmissão vertical de *N. caninum* é altamente variável e improvável a sua persistência em cães, na ausência de transmissão horizontal. Segundo Cedillo et al., (2008), ainda não está esclarecida

a influência do gênero, raça e idade na neosporose canina, no entanto dados acerca da prevalência relacionada com a idade apontam que a grande maioria dos cães se infetam após o nascimento, tendo sido documentadas, por diversos estudos, maiores prevalências em cães mais velhos quando comparados a animais mais jovens (Wouda et al., 1999b; Basso et al., 2001b; de Souza et al., 2002; Capelli et al., 2004; Fernandes et al., 2004; Gondim et al., 2005; Andreotti et al., 2006; Malmasi et al., 2007; Paradies et al., 2007).

A transmissão horizontal, em carnívoros, acontece quando estes ingerem tecidos contendo quistos tecidulares com bradizoítos no seu interior ou de outros alimentos e água contaminada com oocistos de *N. caninum* (Dubey et al., 2007; Marugan-Hernandez, 2017). Schares et al., (2005) colocam a hipótese de a coprofagia poder ser uma forma de disseminação de oocistos pelo ambiente, no entanto a infecção através da ingestão de oocistos (transmissão fecal) parece ser menos importante que o carnivorismo (Dubey e Schares, 2011). Alguns autores sugerem que apesar do consumo de fetos abortados de bovinos poder ser uma fonte de infecção para os canídeos, esta não parece ser uma forma muito relevante de infecção, segundo os trabalhos de Bergeron et al., (2001) e Dijkstra et al., (2002). No entanto, o consumo de membranas fetais de bovinos poderá ser uma importante fonte de infecção, para os cães, uma vez que este parasita foi encontrado em placentas infetadas (Shivaprasad et al., 1989; Fioretti et al., 2000; Bergeron et al., 2001b), além de se ter verificado que, após a ingestão de placentas expulsas por vacas seropositivas, os cães podem eliminar oocistos de *N. caninum*, nas fezes (Dijkstra et al., 2001b). No entanto, num estudo realizado na Holanda, sabe-se que a prevalência de cães infetados de explorações de bovinos é cerca de 4,3 vezes superior à de cães urbanos (Wouda et al., 1999b) e, noutro estudo desenvolvido no Japão, observou-se uma prevalência 4,4 vezes superior em cães de explorações bovinas, comparativamente à população de cães urbanos (Sawada et al., 1998).

Em herbívoros, a transmissão horizontal ocorre pelo consumo de pastagem, água ou qualquer outro tipo de alimento contaminado com oocistos esporulados de *N. caninum* (Dubey et al., 2007; Goodswen et al., 2013). Apesar de, segundo Hall et al., (2005), esta forma de transmissão ocorrer esporadicamente na natureza, Al-Qassab et al., (2010) refuta esta ideia afirmando ser inconsistente com a grande distribuição e aparente alta prevalência de infeções por esta via na natureza, além disso, existem evidências de esta forma de transmissão ser a que tem maior relevância em situações que se observam abortos de carácter epidémico associados a *N. caninum*, nos quais possivelmente ocorreu a infecção de um grupo de fêmeas, não infetadas, através da exposição a uma fonte de infecção num curto período de tempo (McAllister et al., 2000), muito provavelmente, em consequência da ingestão de oocistos esporulados no ambiente.

A transmissão vertical, transplacentária ou congénita, pode ocorrer quando há a passagem de taquizoítos provenientes da mãe infetada via placenta para o feto, infetando este último, podendo ou não provocar aborto (Dubey et al., 2007; Williams et al., 2009). A transmissão transplacentária constitui a principal forma de transmissão de *N. caninum* em bovinos (Barr et al., 1993; Björkman et al., 1996; Anderson et al., 1997; Schares et al., 1998; Khan et al., 2020)



sendo, de todos os agentes causadores de doença em bovinos, o mais eficiente a fazê-lo (Dubey et al., 2007), existindo uma probabilidade elevada, variando entre os 50 a 95%, desta forma de transmissão ocorrer (Davison et al., 1999b; Piergili Fioretti et al., 2003; Cabral et al., 2009; Khan et al., 2020), podendo suceder-se por várias gerações, sendo considerado por Dubey et al., (2007) o principal mecanismo de perpetuação e disseminação da doença nas explorações. Esta forma de transmissão é a dominante em efetivos nos quais a presença deste agente é endémica, caracterizada por infeções crónicas num efetivo, no qual se podem encontrar várias linhas familiares infetadas com este parasita (Hall et al., 2005). Num contexto endémico, os abortos podem persistir por vários meses, ou até mesmo anos (Basso et al., 2010). Apesar de não se perceberem totalmente os mecanismos envolvidos na transmissão transplacentária e morte fetal, sabe-se que ocorre a passagem, via placenta, dos taquizoítos provenientes de uma mãe infetada para o seu feto, causando infeção deste e podendo levar ao aborto (Goodswen et al., 2013).

Apesar da eficiência da transmissão vertical, é evidente que a presença de *N. caninum* numa manada não pode assentar unicamente nesta forma de transmissão, uma vez que a taxa de transmissão por esta via não é de 100%, sendo necessária a ocorrência de transmissão horizontal (French et al., 1999). Além disso, diversos estudos epidemiológicos e observações no terreno fornecem mais dados concretos acerca da ocorrência de transmissão horizontal em bovinos como: (1) o facto de ocorrerem abortos epidémicos, acaba por sugerir exposição de fêmeas não infetadas a uma fonte de infeção num curto período de tempo (Yaeger et al., 1994; M. M. McAllister et al., 1996; McAllister et al., 2000; Sager et al., 2001); (2) o aumento da seropositividade com a idade (Dyer et al., 2000) e (3) a falta de associação entre a seropositividade de vacas e respetivas filhas em manadas infetadas (Thurmond et al., 1997; Mainar-Jaime et al., 1999; Waldner et al., 1999; Dyer et al., 2000; Dijkstra et al., 2001a). Num estudo executado por Dijkstra et al., (2001a), em vacarias holandesas, foram encontradas diferenças notáveis na seroprevalência entre diferentes grupos etários nas manadas estudadas com abortos associados a *N. caninum*, o autor verificou que o grupo etário dos animais seropositivos, tinham tido ou mães seronegativas ou filhas seronegativas. Esta primeira situação é indicativa de infeção por transmissão horizontal das filhas, quanto à segunda situação esta sugere a possibilidade da infeção das mães se ter dado por transmissão horizontal, após o nascimento das filhas seronegativas, sabendo, contudo que, a eficiência de transmissão vertical não é de 100%. As diferenças encontradas na resposta serológica entre manadas com abortos de carácter endémico e manadas com abortos de carácter epidémico associados a *N. caninum*, podem refletir o modo de transmissão/infeção da doença, por exemplo, transmissão vertical numa situação endémica de abortos e transmissão horizontal numa situação epidémica de abortos (Schares et al., 1999).

Estão descritas duas variantes da transmissão transplacentária de *N. caninum* (Fig. 8), sugeridas por Trees e Williams, (2005), para o feto: a transmissão transplacentária exógena que acontece em vacas que se infetam, através da ingestão de oocistos esporulados, durante a gestação, ou a transmissão transplacentária endógena em situações que ocorre a recrudescência (reativação) dos bradizoítos, que se encontravam num estado de latência e de replicação lenta, no interior dos quistos tecidulares, de uma vaca cronicamente infetada. Esta última forma de transmissão vertical pode conduzir ao aborto, no entanto, na maior parte dos casos, verifica-se o nascimento de vitelos saudáveis, mas persistentemente infetados (Anderson et al., 1997; Dubey, 2003; Dubey et al., 2007; McAllister, 2016). Em ambas as situações, ocorre a passagem de taquizoítos pela barreira placentária. A recrudescência ou reativação, em vacas gestantes, seguido da transmissão transplacentária, constitui um fenómeno importante para a manutenção e disseminação da infeção por *N. caninum* de geração em geração numa manada (Hall et al., 2005). Pouco se sabe em relação às razões que levam aos fenómenos de recrudescência da infeção e a sua frequência em animais não gestantes (Goodswen et al., 2013), no entanto pensa-se que a imunodepressão associada à gravidez ou desequilíbrios hormonais possam ser responsáveis por esta reativação (Lindsay e Dubey, 2020).

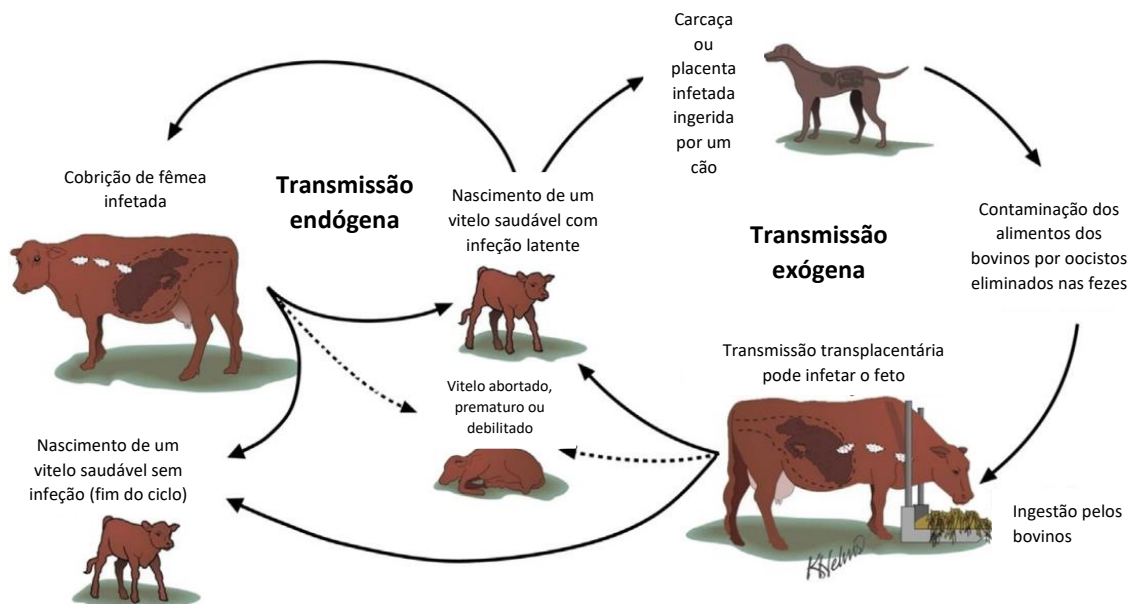


Figura 8. Vias de transmissão de *Neospora caninum* em bovinos. Adaptado de McAllister, (2016)

Vitelos nascidos de mães infetadas, apesar de terem nascido clinicamente saudáveis, têm uma chance de 80 a 90% de serem portadores de *N. caninum* (Paré et al., 1996; Wouda et al., 1998b; Dubey, 1999). Fêmeas múltiparas, apresentam uma maior probabilidade de infetar os seus próprios vitelos. Vacas uma vez infetadas, assim permanecem para o resto da vida (Trees et al., 1999), podendo infetar a sua descendência em gravidezes consecutivas (Piergili Fioretti et al., 2003) ou alternadas (Boulton et al., 1995; Wouda et al., 1998b; Guy et al., 2001), todavia a probabilidade de infeção pode diminuir com o aumento do número de partos, devido ao desenvolvimento e reforço de imunidade que reduz a transmissão transplacentária (Thurmond e

Hietala, 1997a; Romero et al., 2002; Dijkstra et al., 2003; Marugan-Hernandez, 2017). No estudo desenvolvido por Romero et al., (2002) na Costa Rica, em 20 vacarias, as filhas de vacas com seis ou mais partos tinham significativamente uma menor probabilidade de serem seropositivas quando comparadas com filhas de vacas com um ou dois partos. Noutro trabalho realizado por Dijkstra et al., (2003), este procedeu à investigação da relação entre 500 pares vacas-filhas, em 21 vacarias holandesas com história de neosporose, e descobriu que a taxa de infeção congénita nas primíparas era de 80%, nas vacas com dois partos 71%, nas vacas com três partos 67% e nas vacas com quatro ou mais partos 66%.

Nada sugere a existência de eliminação de oocistos nas excreções e secreções de vacas adultas assintomáticas, por conseguinte não se observa a transmissão horizontal de vaca-para-vaca (Dubey et al., 2007).

Apesar de se ter observado a infeção neonatal de vitelos após a ingestão de leite contaminado experimentalmente com taquizoítos (Uggla et al., 1998; Davison et al., 2001) e de se ter demonstrado a presença de ADN de *N. caninum* no leite, incluindo colostro (Moskwa et al., 2007, 2003), não se verificou a ocorrência de transmissão natural deste parasita por via lactogénica (Dijkstra et al., 2001b), também foi equacionada a possibilidade de ocorrer transmissão associada à ingestão de membranas fetais (placentofagia) ou fluidos uterinos contendo quistos (Modrý et al., 2001) ainda que se duvide da importância epidemiológica da transmissão por esta via (Davison et al., 2001; Schares e Conraths, 2001).

A transmissão venérea é possível, mas pouco provável, como provado pelo trabalho de Serrano et al., (2006) após inseminação de novilhas com sémen contaminado com taquizoítos de *N. caninum*, e mais tarde pela observação de um efeito dose-resposta na seroconversão de novilhas inseminadas com sémen contaminado com  $5 \times 10^4$  taquizoítos (Serrano et al., 2007). Não obstante o facto de se ter encontrado ADN de *N. caninum* no sémen de touros naturalmente infetados (Ortega-Mora et al., 2003; Caetano-da-Silva et al., 2004; Ferre et al., 2005), os resultados sugerem que, mesmo existindo taquizoítos viáveis, estes encontram-se em baixo número e de forma pouco frequente, tendo sido verificado por Osoro et al., (2009) que em vacas cobertas por monta natural, com touros infetados experimentalmente, não ocorreu a seroconversão. Adicionalmente, vacas inseminadas com sémen congelado e descongelado contaminado com taquizoítos de *N. caninum* não ficaram infetadas com este agente (Canada et al., 2006).

Assim sendo, a única forma natural epidemiologicamente relevante de infeção em bovinos, após o nascimento, consiste na ingestão de oocistos esporulados no meio ambiente (De Marez et al., 1999; Trees et al., 2002; Gondim et al., 2004a; McCann et al., 2007).

## 2.5. Patogenia do aborto

A neosporose bovina, segundo Dubey et al., (2007), trata-se de uma doença que afeta principalmente a placenta e o feto, resultante de uma parasitemia materna, desencadeada por uma infeção materna primária (exógena) ou na sequência da reativação de uma infeção crónica

(endógena) durante a gravidez. No seguimento da parasitémia, *N. caninum* é capaz de invadir e fixar-se na porção materna da placenta e multiplica-se dando origem a uma reação inflamatória, causando alterações nos tecidos da interface materno-fetal provocando necrose das vilosidades fetais (Buxton et al., 2002; Bartley et al., 2004; Macaldowie et al., 2004). Regidor-Cerrillo et al., (2014) sugerem que este parasita, devido à extensão das lesões que provoca quer nos cotilédones fetais quer nas carúnculas, associado ao facto de provocar poucas lesões no feto, tem um grande tropismo para a placenta, considerando este o fator chave para a ocorrência de aborto após uma primeira infecção durante uma fase precoce da gestação. Além disso, devido ao facto de a carga parasitária ser superior nos cotilédones fetais, os autores sugerem também que *N. caninum* multiplica-se de forma muito ativa na porção fetal da placenta, uma vez que na porção maternal desta, o sistema imune materno exerce a sua atividade sobre este agente. Desta forma, o sistema imunitário fetal também desempenha um papel importante na resistência aos efeitos lesivos deste parasita.

Para que ocorra aborto, o feto e/ou a placenta, têm de ser gravemente alterados ao ponto de deixarem de ser compatíveis com a sobrevivência do feto (Gibney et al., 2008) podendo dever-se a diversos fatores: (1) deformações em tecidos fetais vitais incompatíveis com a sobrevivência do feto ou na placenta, causados pela destruição de células, em resultado da multiplicação do parasita; (2) insuficiente nutrição e oxigenação do feto devido a necrose em áreas da placenta; (3) libertação de prostaglandinas de origem materna, provocando a luteólise e, desse modo, aborto; (4) modificação da imunidade ao nível placentário relacionada com a libertação de citocinas pró-inflamatórias de origem materna, podendo provocar a rejeição do feto (Marugan-Hernandez, 2017). Apesar de todos os fatores enunciados estarem relacionados, a magnitude difere em cada gestação, sendo resultado da fase da gestação, áreas afetadas e dimensão da população parasitária em desenvolvimento, e conseqüentemente também as conseqüências para a gestação e grau de afeção do feto serão diferentes (Dubey et al., 2006; Innes, 2007; López-Gatius et al., 2007a; Gibney et al., 2008; Almería et al., 2010), podendo, se as lesões forem extensas em órgãos vitais do feto, ser motivo de morte do feto (Gibney et al., 2008). A produção de citocinas reguladoras, como a interleucina-10 e interleucina-12 (IL-10 e IL-12), e pró-inflamatórias, como o interferão gama (IFN- $\gamma$ ), e os danos diretos no feto provocados pela multiplicação dos taquizoítos podem condicionar as hipóteses de sobrevivência do feto (Innes, 2007; Rosbottom et al., 2008; Almería et al., 2010; Rosbottom et al., 2011; Almería et al., 2011). Segundo García-Ispuerto et al., (2009), altas concentrações séricas de prolactina em vacas infetadas com *N. caninum* parecem ter um efeito protetor da ação deste parasita na gestação. Noutro estudo desenvolvido por García-Ispuerto et al., (2010), observou-se que níveis elevados de progesterona sanguínea podem ter um efeito positivo sobre a gestação através da modulação da resposta imunitária a cabo dos linfócitos T helper (Th1 e Th2). No entanto, a suplementação artificial com progesterona durante a gestação não reduziu os abortos provocados por este protozoário acabando por levar a um aumento do risco de aborto em vacas com títulos de anticorpos anti-*N. caninum* elevados (Bech-Sàbat et al., 2007).

O risco de transmissão e afeção no feto varia consoante a fase da gestação na altura da infeção. Pensa-se que o facto da probabilidade de transmissão aumentar, com o avançar da gestação, deve-se ao aumento da vascularização placentária, uma vez que a placenta parece ser mais permeável no último trimestre da gestação (Dubey et al., 2007, 2006).

Em animais adultos a infeção natural por *N. caninum* é frequentemente assintomática, o único sinal clínico observável é o aborto em animais gestantes e sinais neurológicos nos vitelos infetados. Os principais fatores responsáveis por influenciar a patogénese desta doença estão relacionados com a capacidade de invasão, multiplicação e permanência intracelular deste parasita, e com a capacidade do hospedeiro criar uma eficiente resposta imune capaz de inibir a proliferação e persistência deste agente (Marugan-Hernandez, 2017).

### **2.5.1. Resposta imunitária**

Consequentemente à infeção por *N. caninum*, o hospedeiro desenvolve uma complexa resposta imune contra este parasita, sendo esta principalmente mediada por células (Almería et al., 2017). A localização intracelular de *N. caninum* promove a ativação dos mecanismos de defesa mediada por células (Innes et al., 2001) [regulada por linfócitos Th1 promovendo a imunidade mediada por células, via linfócitos T citotóxicos e macrófagos, particularmente envolvidas na defesa contra agentes intracelulares (parasitas e vírus)], sendo este mecanismo de defesa crítico para a proteção contra a doença, sendo caracterizado pela produção de IFN- $\gamma$  e outras citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-10 e IL-12 (Marugan-Hernandez, 2017). Estas substâncias pró-inflamatórias são responsáveis pela conversão dos taquizoítos em bradizoítos e pela formação e manutenção dos quistos tecidulares (Williams et al., 2009).

No entanto, durante a gestação ocorre uma imunomodulação de modo a que não haja rejeição fetal. Esta situação leva à alteração do equilíbrio entre os linfócitos Th1 e Th2, permitindo a reativação dos bradizoítos induzindo a sua conversão em taquizoítos, permitindo a disseminação destes rumo à placenta e ao feto (Marugan-Hernandez, 2017), além disso também se verifica uma diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias como IFN- $\gamma$  e IL-12, em particular na interface materno-fetal (Innes et al., 2001), acabando por facilitar a infeção placentária e fetal por este agente.

Assim sendo, este desequilíbrio imunológico faz com que as fêmeas gestantes sejam mais vulneráveis à infeção por via horizontal (primária) de *N. caninum*, comparativamente às não gestantes (Marugan-Hernandez, 2017).

### **2.5.2. Abortos de carácter epidémico, endémico e esporádico associados a *N. caninum***

Os abortos associados a *N. caninum* nas explorações de bovinos podem apresentar um carácter epidémico ou endémico. Existem diversos trabalhos que demonstram que, anos após um surto epidémico de abortos, o efetivo afetado começa a ter abortos esporádicos de carácter endémico (Wouda et al., 1999a; Schares et al., 2002; Björkman et al., 2003). Entende-se por

abortos de carácter epidémico, quando 15% das vacas em risco abortam num período de 4 semanas, 12,5% das vacas abortam em 8 semanas, e 10% abortam em 6 semanas (Moen et al., 1998; Wouda et al., 1999a; Schares et al., 2002). Pelo contrário, quando os abortos são de carácter endémico, verifica-se a persistência destes na exploração por vários meses ou mesmo anos. Como referido anteriormente, estes dois padrões de aborto associado a *N. caninum* estão relacionados com as duas formas de transmissão vertical da infeção por este agente, capazes de causar aborto (Trees e Williams, 2005).

Pensa-se que os abortos de carácter epidémico ocorrem devido a uma infeção primária de vacas, sem qualquer contacto prévio, com *N. caninum*, possivelmente através da ingestão de comida ou água contaminada com oocistos esporulados (McAllister et al., 2000; Sager et al., 2001). Devido ao facto de várias fêmeas gestantes poderem ser expostas à contaminação por oocistos no mesmo intervalo temporal, a infeção transplacentária fetal exógena resultante leva ao aparecimento de abortos num curto período de tempo. Esta hipótese é sustentada pelos trabalhos desenvolvidos por Björkman et al., (2003) e Björkman et al., (2006), que realizaram testes de avidéz da imunoglobulina G (IgG), e verificaram presença de uma baixa avidéz da IgG sugerindo uma infeção recente em explorações com abortos de carácter epidémico (Jenkins et al., 2000; McAllister et al., 2000; Schares et al., 2002). Em situações de abortos epidémicos, segundo Schares et al., (2002) e Wouda et al., (1999a), podem-se atingir taxas de aborto na ordem dos 57%. Num estudo feito por Santolaria et al., (2009), observou-se que a ocorrência de um aborto causado por *N. caninum*, não constitui uma causa de infertilidade em vacas, podendo estas voltar a ser inseminadas após o aborto.

O recrudescimento de uma infeção latente, durante a gestação, resultando numa infeção transplacentária fetal endógena, pode causar aborto (Paré et al., 1997; Stenlund et al., 1999; Guy et al., 2001; Weston et al., 2005). O facto de um animal apresentar uma infeção latente é indicativo que este se infetou de forma vertical (infeção transplacentária) (Anderson et al., 1997) ou após o nascimento (transmissão horizontal) (Moen et al., 1998). Em muitas explorações de bovinos com abortos de carácter endémico por neosporose, existe tipicamente uma associação positiva entre o estatuto serológico da mãe e o da sua descendência, segundo diversos autores, a transmissão vertical é a principal forma de transmissão nestes casos (Björkman et al., 1996; Thurmond et al., 1997; Schares et al., 1998; Wouda et al., 1998b; Bergeron et al., 2000; Dijkstra et al., 2001a; Schares et al., 2002; Björkman et al., 2003; Hall et al., 2005). Vários estudos demonstram que vacas seropositivas cronicamente infetadas apresentam o dobro do risco de abortar quando comparadas com vacas seronegativas (Paré et al., 1997; Wouda et al., 1998b; López-Gatius et al., 2004a), já Thurmond e Hietala, (1997) afirmam que vacas infetadas congenitamente têm um risco de abortar, durante a primeira gestação, 7,4 vezes maior quando comparadas com vacas não infetadas, e que vacas infetadas cronicamente e que já tenham abortado apresentam um risco de novo aborto 5,6 vezes superior quando comparadas com vacas seronegativas e que nunca abortaram. Apesar de tudo até 95% dos vitelos congenitamente infetados, nascidos de mães seropositivas, mantêm-se clinicamente normais (Dubey, 2003).

Thurmond e Hietala, (1997) referem que o risco de infecção endógena pode diminuir com o aumento do número de partos, após verificarem que o risco de aborto em novilhas infetadas congenitamente era muito maior durante a sua primeira gestação, mas não nas gestações subsequentes, quando comparadas com os controlos seronegativos.

Os abortos de carácter esporádico, como o próprio termo avança, ocorrem de forma ocasional e isolada numa exploração (Goodswen et al., 2013).

### **2.5.3. A influência do tempo de gestação no aborto**

As consequências da neosporose durante a gestação irão depender do período no qual ocorre a infecção primária ou a sua reativação (Gibney et al., 2008). Um feto muito jovem não irá ter um sistema imune suficientemente desenvolvido não conseguindo assim controlar a multiplicação de *N. caninum* nos seus tecidos, já um feto perto do termo da gestação conseguirá limitar o desenvolvimento de lesões e favorecer o aparecimento de quistos tecidulares, tornando-se cronicamente infetado. A gestação em bovinos dura, em média, 280 dias, e o sistema imune do feto vai-se desenvolvendo progressivamente de modo a que este possa nascer imunologicamente competente (Dubey et al., 2006). Durante o primeiro trimestre da gestação o feto é imunologicamente incompetente e, por conseguinte, extremamente vulnerável à ação de *N. caninum*, ocorrendo frequentemente morte fetal e reabsorção nestes casos. O segundo trimestre da gestação, altura em que o sistema imune fetal ainda é imaturo, é aquele em que a taxa de abortos e transmissão transplacentária é mais elevada, conduzindo ao aparecimento de vitelos infetados congenitamente com sinais clínicos associados. No caso da infecção ocorrer no último trimestre da gestação, o feto já é capaz de sobreviver, no entanto a probabilidade de ocorrer transmissão transplacentária é grande, o que se traduz no nascimento de vitelos saudáveis, mas infetados congenitamente podendo contribuir para a manutenção deste parasita na exploração, no caso de vir a ser reprodutor (Marugan-Hernandez, 2017).

### **2.5.4. Neosporose em Bovinos**

Como referido previamente, *N. caninum* é considerada uma das mais importantes causas de aborto quer para bovinos leiteiros quer para bovinos de carne. A maioria das vacas infetadas têm uma gestação normal, no entanto vacas infetadas têm maior probabilidade de abortar de que vacas não infetadas, especialmente se adquiriram a infecção pela primeira vez numa fase precoce da gestação (Goodswen et al., 2013). Vacas de qualquer idade podem abortar a partir dos três meses de gestação até ao termo desta, sendo que a maior parte dos abortos ocorrem entre os cinco e seis meses de gestação (Anderson et al., 1991; Wouda et al., 1998b; Stenlund, 2000). Os fetos podem morrer *in utero* e ser reabsorvidos, mumificados, autolisados, nados-mortos, podem nascer vivos mas com sinais clínicos, ou nascer clinicamente saudáveis porém infetados congenitamente (Dubey e Schares, 2011; Alvarez-García et al., 2013). A razão para a existência destes diferentes desfechos, assenta no sistema imune fetal, uma vez que em animais imunocomprometidos verifica-se o desenvolvimento de formas de neosporose mais graves, em

contrapartida animais imunocompetentes vulgarmente não desenvolvem apresentações clínicas da infeção (Nishikawa, 2017). Todavia, a presença de sinais clínicos também é influenciada pela altura da gestação em que ocorre a infeção materna e fetal, bem como a fase de desenvolvimento do sistema imune, o tempo em que o feto é exposto ao parasita, a quantidade de parasitas ativamente em multiplicação, e a localização das lesões a nível orgânico e no sistema nervoso central (Anderson et al., 1997), sendo este último o tecido mais afetado por *N. caninum* (Dubey et al., 2006; Khan et al., 2020).

A presença de *N. caninum* foi demonstrada nos tecidos de quatro fetos, num grupo de 15 fetos mumificados, por Ghanem et al., (2009), os autores confirmaram que estes fetos testaram negativo para a presença do gene autossómico recessivo SLC35A3, responsável por provocar o complexo de malformação vertebral, que se trata de uma doença genética hereditária letal, responsável por causar mumificação fetal, abortos ou nados-mortos (Agerholm et al., 2001; Nielsen et al., 2003). Os resultados deste estudo sugerem que *N. caninum* foi o responsável pela mumificação fetal (Ghanem et al., 2009).

Na generalidade dos casos, em bovinos adultos não se observam quaisquer sinais clínicos provocados pela infeção por *N. caninum*, para além dos abortos e nados-mortos (Marugan-Hernandez, 2017). No entanto, Barling et al., (2000) descreveram a perda de peso em gado de carne, como um sinal da infeção por este parasita. Thurmond e Hietala, (1997b), num estudo realizado em 372 vacas de primeira lactação, verificaram que os animais seropositivos tinham uma diminuição de quase 1,5 quilos na sua produção média diária de leite quando comparados às fêmeas seronegativas, noutro estudo feito por Hernandez et al., (2001) com 565 vacas, os autores observaram uma diminuição da produção diária semelhante (menos 1,3 quilos) nos animais seropositivos, esta redução é expectável que ocorra devido à interferência com a duração da lactação e período seco (McAllister, 2016). Já Hobson et al., (2002) chegaram à conclusão que a influência da infeção por este parasita sobre a produção de leite depende da existência ou não de problemas de abortos nas explorações, tendo observado que em explorações com grande número de abortos as vacas seropositivas produziam menor quantidade de leite, ao passo que em explorações sem problemas de abortos, não haviam diferenças significativas entre os animais seropositivos e seronegativos. Mais recentemente, Regidor-Cerrillo et al., (2014) verificaram que ocorre um aumento gradual da temperatura retal até ao pico alcançado no dia cinco após a infeção por *N. caninum*.

A apresentação clínica nos animais jovens ocorre, de forma pouco frequente, em vitelos com idade inferior a dois meses, sendo este agente responsável por provocar afeções neurológicas (devido à encefalomielite e polimiosite), incapacidade para se levantar e nascimento de vitelos com um peso inferior ao normal (Dubey e Schares, 2011).

Fetos abortados numa fase precoce da gestação apresentam-se frequentemente sinais de autólise, e a placenta tipicamente apresenta focos de necrose multifocal no interior dos cotilédones, no entanto as áreas intercotiledonárias permanecem intactas. Os focos de necrose normalmente evidenciam áreas com um intenso infiltrado inflamatório por células mononucleares



e calcificação distrófica. Estes infiltrados celulares originam-se nas carúnculas e estendem-se até aos cotilédones, demonstrando áreas de hemorragia e necrose. Em fetos abortados ou vitelos nado-mortos, as lesões são comumente encontradas a nível cerebral, e consistem essencialmente em agregados perivasculares com leucócitos nos espaços perivasculares, gliose, e presença de pequenas áreas multifocais de necrose por liquefação, rodeados por gliose. De forma menos frequente, podem-se também observar focos de inflamação não supurativos no coração, fígado ou, mais raramente, nos rins, músculo esquelético ou pulmões. Vitelos infectados congenitamente e que apresentem sinais clínicos, tipicamente exibem lesões inflamatórias na medula espinhal e, de forma menos frequente, no cérebro (Marugan-Hernandez, 2017). Podem apresentar os membros posteriores, mais frequentemente, e/ou dos membros anteriores fletidos ou em hiperextensão (Dubey e Schares, 2011), ataxia, hiporreflexia, perda da propriocepção consciente, paralisia e, ocasionalmente, defeitos congénitos como hidrocefalia, hipoplasia cerebelar, exoftalmia ou aparência assimétrica dos olhos, estenose espinhal e escoliose (Dubey, 2003; Dubey e Schares, 2011). Por fim, em vitelos sem sinais clínicos e em animais adultos, as lesões estão tipicamente confinadas a quistos tecidulares encontrados principalmente no cérebro e, de forma menos frequente, no coração, fígado e músculos (Marugan-Hernandez, 2017).

### **2.5.5. Neosporose em cães**

Geralmente, a neosporose é uma doença assintomática em cães adultos e geriátricos (Lindsay e Dubey, 2000; Kul et al., 2015), no entanto em cães jovens, tipicamente de idade inferior a seis meses, observam-se formas de infeção mais graves (Silva e Machado, 2016). Esta doença pode adquirir um carácter localizado ou generalizado e teoricamente todos os órgãos poderão estar envolvidos, incluindo a pele. Na maior parte dos casos, os sinais clínicos são generalizados e semelhantes aos observados na toxoplasmose, contudo predominam sinais neuromusculares como a paralisia dos membros posteriores, podendo também observar-se uma forma cutânea desta doença (La Perle et al., 2001; Tarantino et al., 2001; Ordeix et al., 2002). Em cachorros, os sinais clínicos começam, geralmente, entre as três a nove semanas de idade. A atrofia dos membros posteriores e a rigidez muscular gradual são os sinais clínicos mais relevantes, permitindo distinguir a neosporose de outras doenças responsáveis por causar paralisia. Tipicamente, os membros posteriores são afetados de forma mais grave, comparativamente aos membros anteriores, e usualmente apresentam-se em hiperextensão (Buxton et al., 2002). A paralisia dos membros afetados progride para uma contratura muscular. Pode ocorrer, em cachorros, deformação das articulações e encurvamento das mesmas (*genu recurvatum*), seguida de fragilidade a nível cervical, disfagia, megaesófago, e poderá culminar na morte do animal (Cummings et al., 1988; Dubey et al., 1988a; Knowler e Wheeler, 1995; Sykes, 2014). Podem ocorrer outras disfunções, como dificuldades na deglutição, paralisia dos músculos mastigadores, flacidez muscular, atrofia muscular e até mesmo paragem cardíaca. Cães em que se observa paralisia dos membros posteriores, podem manter-se alerta e sobreviver por vários meses, necessitando de múltiplos cuidados especiais (Sykes, 2014).

Adicionalmente, podem ocorrer episódios de diarreia severa, incoordenação, consolidação pulmonar multifocal acompanhada de necrose, na altura da necropsia (broncopneumonia necrótica e purulenta), enterite fibrino-hemorrágica (com atrofia das vilosidades e hiperplasia das criptas no jejuno e íleo), miocardite, e encefalite não purulenta em cachorros (Kul et al., 2015).

Em cães com mais de seis meses, é mais provável que a presença desta doença resulte da reativação de uma infeção crónica latente. Cães adultos tipicamente desenvolvem polimiosite e/ou meningoencefalite, com sinais clínicos provocados por lesões multifocais no sistema nervoso central, especialmente no cerebelo, ainda assim, de forma menos comum, pode-se observar a ocorrência de miocardite, dermatite, pneumonia, peritonite difusa acompanhada de efusão peritoneal e, mais raramente, disseminação multifocal causada por uma grande propagação de taquizoítos (Sykes, 2014). As lesões de dermatite podem ser muito graves, dependendo do número de taquizoítos de *N. caninum* envolvidos (Buxton et al., 2002; Dubey, 2003). Os cães adultos afetados, frequentemente mostram-se letárgicos e podem desenvolver diversos sinais neurológicos como ataxia, movimentos circulatorios, cabeça inclinada, nistagmos, hipermetria, tremores da cabeça, défices proprioceptivos, disfunção dos nervos cranianos, anisocoria, tetraparésia, hiperestesia cervical, e convulsões (Sykes, 2014). Numa fase crónica, a maioria dos animais permanecem assintomáticos. No entanto, durante a gestação, as fêmeas ao sofrerem uma imunomodulação pode ocorrer a reativação da infeção, levando à conversão dos bradizoítos em taquizoítos, que depois podem atravessar a placenta e infetar o feto (Quinn et al., 2002; Williams et al., 2009).

A neosporose deve ser considerada em cães que se apresentem, no exame físico, com hiperestesia, tumefação ou atrofia muscular. A lista de diagnósticos diferenciais para afeções neurológicas em cães é vasta, mas a neosporose também deve ser sempre incluída como diagnóstico diferencial (Silva e Machado, 2016). Saey et al., (2010) observaram lesões focais a nível cerebral e espinhal, num cão de seis anos com um vasto infiltrado de células mononucleares (grande número de linfócitos T e B, com um menor número de macrófagos) nas raízes nervosas lombares e da *cauda equina*, tendo observado também cerebelite necrotizante e hepatite.

### **2.5.6. Neosporose em búfalos**

Em búfalos, a manifestação natural de doença é rara, mas encontra-se descrita a ocorrência de abortos em animais que contactaram com cães, num estudo feito por Nasir et al., (2011) e noutros estudos realizados por de Barros et al., (2020) e Ciuca et al., (2020), evidenciando o papel importante dos canídeos H.D. na epidemiologia da neosporose nestes animais (Kengradomkij et al., 2015).

### **2.5.7. Neosporose em ovinos**

*N. caninum* foi diagnosticado pela primeira vez num borrego infetado congenitamente em Inglaterra (Dubey et al., 1990). Este borrego tinha nascido fraco, parcialmente atáxico, tendo

morrido com apenas uma semana de idade, com redução unilateral da massa cinzenta no corno ventral da medula espinhal e cavitação local. Historicamente, este foi o primeiro registo de uma infeção semelhante à de *N. caninum* em pequenos ruminantes (Dubey et al., 1990). Este caso tinha sido publicado por Hartley e Bridge, (1975) porque os autores tinham pensado que se tratava de um caso de toxoplasmose. Após a descoberta do parasita *N. caninum*, Dubey et al., (1990a), examinaram retrospectivamente os tecidos do borrego, tendo encontrado apenas quistos tecidulares, e concluíram que se tratava, não de uma infeção por *T. gondii* como havia sido suspeitado, mas sim de uma infeção por *N. caninum*. Posteriormente, reportaram-se casos de neosporose em ovinos no Japão por Kobayashi et al., (2001) e Koyama et al., (2001).

No entanto, apesar de se saber que *N. caninum* constitui um dos principais agentes abortivos em bovinos, com transmissão vertical extremamente eficaz, ainda pouco se sabe acerca da sua ação sobre pequenos ruminantes (Dubey et al., 2007; Dubey e Schares, 2011; Lindsay e Dubey, 2020). A sua prevalência em ovinos varia entre áreas geográficas (Dubey et al., 2007). A infeção por este agente, segundo Dubey et al., (2007) e Dubey e Schares, (2011) é capaz de provocar aborto, morte neonatal, e nascimento de borregos fracos, e que poderão servir como modelos alternativos para o estudo de neosporose bovina (Dubey, 2003). O'Handley et al., (2002) comprovaram que as ovelhas podem-se infetar após ingestão de oocistos de *N. caninum*. O papel deste protozoário como causa de aborto em ovinos tem sido investigado em diversos trabalhos, provenientes de diversas localizações (Dubey e Lindsay, 1990; Dubey et al., 2007; Howe et al., 2012; Moreno et al., 2012). Têm-se feito progressos na perceção que a neosporose pode ter um papel importante como doença abortiva em ovinos (Dubey e Lindsay, 1990; Dubey e Schares, 2011; Howe et al., 2012) e que o risco de aborto está associado com a dose, altura da gestação e forma de infeção, tendo sido relatada transmissão vertical em ovinos por González-Warleta et al., (2018) e Gutiérrez-Expósito et al., (2020). Atualmente, ainda não existe qualquer tratamento eficaz ou vacina, comercialmente disponível, contra a neosporose ovina (Dubey et al., 2007; Marugan-Hernandez, 2017).

Recentemente, numa análise retrospectiva dos dados serológicos de ovinos (incluindo fetos abortados) submetidos para análise entre 2010 e 2019 em Israel, feita por Tirosh-Levy et al., (2022), os autores indicaram uma prevalência de infeção por *N. caninum* de 67,4%, nos ovinos analisados, e de 22,9% nos fetos abortados. Demonstrando que, em áreas em que *N. caninum* é endémico, a prevalência deste agente em ovinos será alta e que deverá ser considerado uma causa importante de aborto.

### **2.5.8. Neosporose em caprinos**

Foram descritos casos de aborto e mortalidade neonatal associadas à infeção por *N. caninum* em cabras de raça pigmeu (Barr et al., 1992; Dubey et al., 1992a), numa exploração de cabras leiteiras na Costa Rica (Dubey et al., 1996b). Pouco se sabe acerca da prevalência de *N. caninum* em caprinos (Dubey, 2003). No entanto, experimentalmente sabe-se que cabras de raça pigmeu são bastante suscetíveis à infeção por *N. caninum*. Lindsay et al., (1995) observou que

as cabras infetadas durante a gestação abortaram fetos infetados com este protozoário. Um trabalho feito por Moreno et al., (2012), revelou que *N. caninum* desempenha um papel importante no aborto de caprinos e ovinos. Recentemente, de Oliveira Junior et al., (2020) verificou a presença de transmissão vertical de *N. caninum*, por gerações sucessivas em seis famílias de cabras infetadas congenitamente, com taxas de transmissão entre os 71,4 a 100%.

### 2.5.9. Neosporose em Equinos

*N. caninum* foi encontrado, pela primeira vez em equinos, por Dubey e Porterfield, (1990) nos tecidos de um poldro abortado, Lindsay et al., (1996) encontrou um poldro infetado congenitamente, e cinco cavalos adultos foram observados por diferentes autores (Gray et al., 1996; Marsh et al., 1996; Daft et al., 1997; Hamir et al., 1998; Cheadle et al., 1999b). Marsh et al. (1998) após inoculação de uma cultura de células em tecido cerebral de um cavalo, sugeriram uma nova espécie, *Neospora hughesi*, com base em diferenças relativamente a proteínas, perfis da região ITS1, e morfologia dos quistos tecidulares, responsável por afetar apenas equinos (Marsh et al., 1998; Dubey et al., 2002a; Leszkowicz Mazuz et al., 2020), causando problemas neurológicos associados à encefalite causada e mortalidade neonatal (Dubey et al., 2001b).

Marsh et al., (1998), descreveram os quistos tecidulares de *N. hughesi* como sendo de tamanho inferior aos de *N. caninum* e com paredes mais finas, menos de 1,0 µm de espessura, e os bradizoítos com dimensões inferiores aos de *N. caninum*. No entanto, sugere-se não ser *N. hughesi* a única espécie que afeta equinos, uma vez que Daft et al., (1997) e Lindsay et al., (1996) encontraram quistos tecidulares de parede espessa típicos de *N. caninum*. Em verdade, estudos recentes realizados por Leszkowicz Mazuz et al., (2020) demonstram que *N. caninum* é a espécie principalmente responsável por provocar aborto, e sugerem que possa ser uma causa significativa de aborto em equinos, reforçando o facto da transmissão transplacentária ser uma importante forma de transmissão de *N. caninum* que, à semelhança dos bovinos, pode ocorrer em éguas com infeções crónicas, ou em éguas que são infetadas durante a gravidez (Dubey e Schares, 2011).

Atualmente pouco se conhece acerca do ciclo de vida de *Neospora hughesi* e, apesar de se saber que os canídeos são os H.D. de *N. caninum* (McAllister et al., 1998a), ainda não está estabelecido se estes poderão ser hospedeiros definitivos de *N. hughesi* (Reed et al., 2016). A transmissão vertical transplacentária de *N. caninum* em bovinos ocorre de forma altamente eficaz, e estudos recentes indicam que *N. hughesi* também pode ser transmitido verticalmente de forma transplacentária em equinos (Pusterla et al., 2011; Antonello et al., 2012). Segundo Mazuz et al., (2021), os equinos podem ser infetados pelas duas espécies deste género, e que, com o conhecimento do que acontece nos bovinos, pensa-se que *N. caninum* seja o principal responsável por provocar aborto, e que *N. hughesi* está mais relacionado com as afeções neurológicas (Dubey et al., 2017), no entanto ainda não está bem clarificado o papel desta última espécie no aborto equino. Além disso, referem ainda que a maior parte dos inquéritos epidemiológicos associados à infeção por *Neospora* spp. e aborto, assentam em métodos

serológicos, sendo que estes apresentam reação cruzada para ambas as espécies, de modo que não permitem uma diferenciação com exatidão entre os dois parasitas (Packham et al., 2002).

Em Portugal, Cruz et al., (2019) encontraram pela primeira vez anticorpos anti-*Neospora* spp. em cavalos. Noutro estudo, realizado por Waap et al., (2020), para averiguar a prevalência de *N. caninum* num universo de 385 equinos, foi reportada uma exposição a este agente em 9,1% dos animais em estudo.

Recentemente, Rahmani et al., (2022) identificaram *N. caninum* como causa de aborto em burros, sugerindo que este agente possa ser uma causa significativa de aborto em asininos.

## 2.6. Impacto Económico da Neosporose

Atualmente, a neosporose, causada pelo protozoário *N. caninum*, é considerada uma das principais doenças causadoras de aborto em bovinos com maior impacto económico a nível mundial (Monney et al., 2011; Reichel et al., 2013).

Não existem dados suficientes para quantificar, de forma exata, as perdas económicas associadas à neosporose na atividade pecuária, mas estima-se que as perdas ascendam os milhões de dólares a nível mundial (Dubey, 2003). Tendo em conta que a percentagem de abortos nas explorações pode ascender a valores, segundo Schares et al., (2002) e Wouda et al., (1999a), na ordem dos 57%, o impacto económico de cada aborto, mumificação fetal, reabsorção embrionária e nado-morto, aumento do intervalo entre partos, irá depender dos custos diretos, que esses problemas acarretam, o valor do feto perdido, e todos os custos indiretos associados, como as despesas com médicos veterinários e os custos associados ao processo de diagnóstico do aborto que é dispendioso e difícil (Dubey e Schares, 2006; Ortega-Mora et al., 2006). Além destes custos também se verificam perdas na produção leiteira, maiores gastos na aquisição de novilhas de substituição, devido ao refugo prematuro dos animais que abortaram, e a diminuição do valor comercial dos animais (Thurmond e Hietala, 1996, 1997b; Trees et al., 1999; Hernandez et al., 2001; Dubey et al., 2007; Monney et al., 2011). Segundo Dubey e Schares, (2011), o refugo prematuro, de animais infetados, poderá representar um dos maiores custos associados à neosporose. Lamentavelmente, não existem trabalhos que contabilizem corretamente os prejuízos associados ao aborto por *N. caninum* em bovinos de carne quer por ser difícil encontrar pequenos fetos abortados, no primeiro trimestre de gestação, quer por o diagnóstico etiológico de aborto não ser um processo fácil (Dubey, 2003). No entanto, Barling et al., (2000) estimaram os prejuízos associados a vitelos de carne seropositivos, que consistem numa diminuição de diferentes indicadores zootécnicos como o ganho médio diário, peso ao desmame e peso da carcaça, bem como os custos mais elevados no tratamento de doenças destes animais, tendo projetado perdas na ordem dos 15,62 dólares (14,20 euros) por vitelo. Thurmond e Hietala, (1997b) e Hernandez et al., (2001) verificaram que os animais seropositivos tinham uma diminuição de quase 1,5 quilos na sua produção média diária de leite. Contrariamente, Hobson et al., (2002) chegaram à conclusão que não existe influência da infeção por este parasita sobre a produção de leite.

A nível global, Reichel et al., (2013) estimam que as perdas associadas a abortos provocados por *N. caninum* sejam superiores a 1 298 mil milhões de dólares anuais podendo até atingir os 2 380 mil milhões de dólares anuais, afetando as indústrias de laticínios e de comércio de carne bovina. Monney et al., (2011) referem que, em explorações da Califórnia, cerca de 40 mil abortos são causados por este protozoário, levando a prejuízos aproximados de 35 milhões de dólares anuais. Na Nova Zelândia e Austrália, estimam-se prejuízos de mais de 100 milhões de dólares anuais (Reichel, 2000; Pfeiffer et al., 2002). Num estudo desenvolvido na Suíça, por Häsler et al., (2006), os prejuízos anuais relacionados com a infeção de *N. caninum*, no efetivo leiteiro suíço, estão calculados em quase dez milhões de euros. No Canadá, estimaram-se perdas anuais de quase 50 dólares por vaca leiteira (Chi et al., 2002). Na Holanda, 76% das explorações positivas a *N. caninum*, mas sem abortos, não tiveram prejuízos, no entanto as restantes explorações seropositivas apresentaram perdas de dois mil euros anuais (CJM et al., 2006). Na Turquia, Demir et al., (2020) estimaram que os custos anuais associados à infeção por *N. caninum* eram de 710 dólares por vaca, representando anualmente na economia turca cerca de 40 milhões de dólares, neste estudo também foi determinada a distribuição dos custos por vaca, sendo que 67,3% representavam os custos dos abortos, 16,8% o aumento do intervalo entre partos, 4,6% as perdas da produção de leite, 3,5% as inseminações artificiais adicionais, e 7,7% para as despesas veterinárias e associadas ao diagnóstico. Na Argentina, Moore et al., (2013) reportaram os imensos prejuízos económicos associados à infeção por *N. caninum* em bovinos de carne e leiteiros, estimando que os prejuízos económicos associados a um aborto eram de 1 415 dólares em gado leiteiro, representando total de perdas na ordem dos 33 milhões de dólares para a indústria leiteira na região húmida de Pampa. Quanto aos bovinos de carne, os custos associados a um aborto provocado por este parasita encontram-se na ordem dos 440 dólares, traduzindo-se num prejuízo total de quase 13 milhões de dólares anuais para a indústria da carne, na mesma área geográfica referida anteriormente. No Brasil, à semelhança do que se verifica na Argentina, *N. caninum* é responsável por causar grandes prejuízos económicos, sendo estimado por Reichel et al., (2013) prejuízos médios na ordem dos 51 milhões de dólares em explorações leiteiras e 101 milhões de dólares na fileira de carne de bovino (Schmidt et al., 2018).

Estes dois últimos estudos acabam por demonstrar a influência que este parasita tem sobre a economia e produção de duas das regiões mais importantes na criação de gado bovino do mundo.

Em Portugal, de modo a contribuir para o conhecimento da neosporose bovina, foram analisados diversos fetos abortados, bem como soros de bovinos, provenientes de explorações leiteiras das zonas centro e norte de Portugal continental, tendo sido observada uma prevalência de 28% na população geral em estudo, 46% em explorações com história de aborto e 36% nos fetos abortados (Canada et al., 2004). Dada a elevada percentagem de fetos abortados positivos para este agente em associação com uma alta prevalência de infeção em animais adultos, quer na população em geral, quer nas explorações com história de aborto, a infeção por *Neospora*

*caninum* deve constar sempre na lista de diagnósticos diferenciais para situações de aborto, nas explorações portuguesas (Canada et al., 2004), ainda que, a presença do agente, não seja suficiente para o responsabilizar pela causa de aborto.

Segundo Pinto et al, (2003) citado por Canada, (2004), a neosporose bovina na Ilha de S. Miguel, Açores, apontam para uma prevalência de 36% em bovinos leiteiros com história de aborto e, de 30% nos fetos de bovinos abortados. Estes resultados revelam a importância da neosporose bovina tanto em Portugal continental, como nos Açores (Benevides, 2005).

Não existiam quaisquer estudos referentes ao impacto económico da neosporose bovina em Portugal (Canada et al., 2004), o que continua a ser uma realidade na atualidade, o que não contribui para a promoção de atividades com os produtores pecuários, no sentido de desenvolver ações que contribuam para o controlo e erradicação da neosporose e, minimizar a maior disseminação da neosporose (Demir et al., 2020).

## 2.7. Diagnóstico de Neosporose

O aborto constitui um dos principais problemas para a pecuária, a nível mundial. E, o diagnóstico da causa de aborto raramente chega aos 50%, mesmo em laboratórios especialmente dedicados a este assunto, já que a presença de um agente não é sinónimo de ser esse o agente etiológico do aborto (Anderson et al., 2000, 1991). Estabelecer uma relação causa-efeito entre aborto e infeção por *N. caninum* é algo ainda mais complexo, devido à presença, bastante comum, de animais infetados congenitamente por este agente mas que permanecem assintomáticos, e mesmo encontrando a presença do parasita ou ADN deste não quer dizer que o aborto tenha sido causado por este agente (Dubey et al., 2007). É importante reter que, em estudos feitos na Califórnia e na Holanda, cerca de 20% dos diagnósticos de aborto associados à infeção por *N. caninum* são baseados na exclusão de todas as outras causas de aborto e pela observação de lesões associadas a este agente e de formas parasitárias em fetos abortados (Anderson et al., 1991; Wouda et al., 1997b).

Para se diagnosticar neosporose bovina, é extremamente importante aliar a história clínica com os dados epidemiológicos da exploração, considerando o carácter epidemiológico dos abortos (endémico, epidémico ou esporádico) e a altura da gestação em que ocorrem os abortos. Além disso, é importante ter em conta certos fatores de risco relacionados com os abortos provocados por *N. caninum*. Diferentes estudos demonstraram que existe uma forte associação entre a ocorrência de surtos de abortos, a prevalência de *N. caninum*, a presença e o número de cães com acesso aos bovinos e às forragens (Paré et al., 1998; Bartels et al., 1999; Schares et al., 2004b; Hobson et al., 2005). A presença de outras espécies (canídeos) possíveis H.D., causas de imunodepressão, e outros fatores como: idade, raça, condições climáticas e localização da manada também foram descritos como fatores de risco (Hemphill e Gottstein, 2000; Schares et al., 2003, 2004b; Haddad et al., 2005; Thurmond et al., 2005).

Através da relação entre os fatores descritos anteriormente é possível apontar a possibilidade de os abortos serem causados por *N. caninum*, no entanto o diagnóstico definitivo

apenas pode ser feito com recurso a testes de diagnóstico laboratorial (Anderson et al., 2000). É, no entanto, necessário, para estabelecer uma relação causa-efeito, utilizar uma abordagem diagnóstica compreensiva, por exemplo com recurso a métodos serológicos, imunohistoquímicos, histopatológicos e outros métodos que permitam, para além de demonstrar a infeção da mãe e do feto abortado, encontrar lesões associadas a essa presença, e que possam ter implicado o aborto (Dubey e Schares, 2006). Para alcançar esse objetivo, é importante demonstrar a presença de taquizoítos de *N. caninum* nas lesões observadas e excluir outras causas de aborto (Dubey e Schares, 2006).

No entanto, existem dois problemas relacionados com o diagnóstico: em primeiro lugar, a ausência de sinais clínicos, poderá ser difícil realizar o diagnóstico de infeção em animais cronicamente infetados ou em vitelos infetados congenitamente; além disso os critérios de diagnósticos e as técnicas usadas também podem interferir com a obtenção de um diagnóstico final (Ortega-Mora et al., 2006).

Atualmente, existe uma grande diversidade de exames complementares laboratoriais que auxiliam no diagnóstico de *Neospora* spp. como agente etiológico. Para diagnosticar a infeção por *N. caninum* podem ser utilizados: métodos diretos, detetando formas parasitárias ou substâncias antigénicas deste, como a observação direta dos quistos tecidulares ao microscópio em tecidos a fresco, o exame histopatológico, imuno-histoquímica (IHQ), deteção de ADN parasitário por PCR (Reação em cadeia da polimerase), e isolamento *in vitro* e *in vivo*; ou métodos serológicos, capazes de detetar evidências imunológicas da infeção, ou seja, detetar a presença de anticorpos anti-*Neospora* spp. no soro, plasma e leite (Alvarez-García et al., 2013), como a imunofluorescência indireta (IFAT), immunoblotting, testes de aglutinação direta modificados para *Neospora* spp. (NAT) e uma grande variedade de ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA) (Andreotti et al., 2003; Ghalmi et al., 2014).

### **2.7.1. Exame microscópico a fresco**

Em bovinos, este exame é feito principalmente em fetos abortados, podendo ser realizado em amostras de cérebro ou de medula espinhal, com 2-3 mm<sup>3</sup> de tamanho, comprimidas contra uma lâmina de vidro, sem coloração (Fig. 9).

O número de quistos encontrados numa amostra é variável, tendo-se encontrado até 20 quistos (Andreotti et al., 2003). Em bovinos, estes quistos tipicamente apresentam um tamanho pequeno, entre 5-50 µm de diâmetro, com a espessura da parede a variar entre <1 a 2,5 µm, sendo que a espessura da parede é independente do tamanho do quisto (Dubey et al., 2002a). Gondim et al., (2001), descreveu em cães, murganhos, gerbilos e em vitelos quistos de parede espessa (> 1 µm).



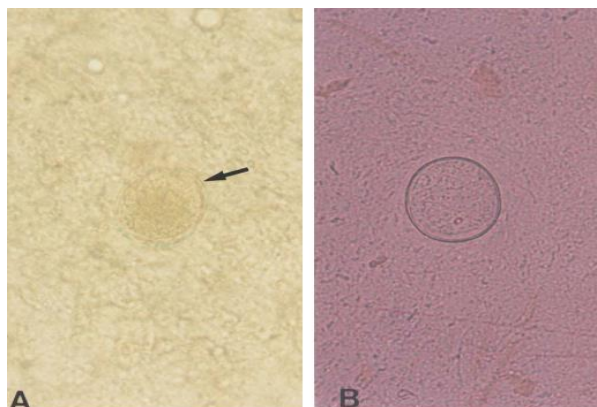


Figura 9. Quistos de *N. caninum*. (A) Quisto de parede espessa (seta) com 31  $\mu\text{m}$  de diâmetro, no cérebro de um murganho inoculado com amostras de cérebro de vitelo infetado com *N. caninum*. (B) Quisto de parede espessa com 33  $\mu\text{m}$  de diâmetro, no cérebro de um gerbilo.

### 2.7.2. Histopatologia

A forma mais adequada de diagnosticar um aborto causado por *N. caninum* é através da análise histopatológica dos fetos abortados (Baszler et al., 1999; Dubey e Schares, 2006; Ortega-Mora et al., 2006), seguido da identificação das formas parasitárias por imuno-histoquímica (Lindsay e Dubey, 1989b; Barr et al., 1991a; Dubey e Lindsay, 1993).

As lesões tipicamente observadas, embora não sendo patognomônicas de neosporose, incluem encefalite necrotizante não supurativa multifocal e miocardite não supurativa, podendo ou não ser observada necrose focal no fígado, permitindo assim um diagnóstico presuntivo (Barr et al., 1991b; Wouda et al., 1997b), no entanto será sempre necessária a confirmação da infecção por imuno-histoquímica ou por PCR, uma vez que é difícil haver um número suficientemente grande de taquizoítos ou quistos tecidulares de *N. caninum* que permita uma detecção fácil nos cortes histológicos (Cabral et al., 2009), além disso outros protozoários como *Sarcocystis* spp. podem causar lesões semelhantes (Jenkins et al., 2002). Assim sendo, a histopatologia deve ser usada como um exame complementar ao diagnóstico, devendo ser interpretada em associação à imuno-histoquímica ou PCR, que identificam o agente etiológico.

#### 2.7.2.1. Fetos e vitelos nados-mortos

É possível encontrar lesões degenerativas e inflamatórias, por todos os tecidos fetais, mas os locais tipicamente afetados e onde é possível encontrar estas lesões são o sistema nervoso central (SNC), coração, e o fígado (Barr et al., 1990; Anderson et al., 1991; Barr et al., 1991b; Nietfeld et al., 1992; Barr et al., 1993; Wouda et al., 1997b; Dubey et al., 1998; Helman et al., 1998; Boger e Hattel, 2003; Dubey et al., 2006).

As lesões macroscópicas são raras, mas podem estar presentes no coração, músculo esquelético, e no cérebro. Podem ser encontrados focos brancos nos tecidos musculares e cardíaco, pequenos focos de necrose pálidos a escuros no cérebro e pode-se, por vezes observar hidrocefalia (Dubey et al., 1998). Frequentemente os fetos estão autolisados e/ou

mumificados. Podem-se observar áreas focais descoloradas nos cotilédones (Piergili Fioretti et al., 2003)

As lesões microscópicas podem estar presentes em diversos órgãos, mas são comumente observadas no SNC, coração, fígado, como exemplificado na figura 10. As lesões neurais são observadas a nível espinhal e cerebral, e consistem em encefalomielite não supurativa, caracterizadas por infiltrados multifocais não supurativos, podendo ter ou não necrose multifocal e infiltração multifocal a difusa não supurativa de leucócitos ao nível das meninges. A lesão tipicamente característica de neosporose, no SNC, consiste numa infiltração focal de células mononucleares em redor de uma área de necrose central (Fig. 10A). Em fetos mais velhos, capazes de reagir à ação do parasita, cujo aborto ocorreu no terceiro trimestre de gestação, a multiplicação do parasita é mais restrita, sendo comum observar-se pequenos focos de necrose rodeados por um intenso infiltrado inflamatório contendo células da microglia, astrócitos reativos, bem como monócitos e linfócitos (Dubey et al., 2006), ocasionalmente verifica-se calcificação (Boulton et al., 1995).

As lesões a nível do miocárdio são graves, mas frequentemente mascaradas pela autólise. Tipicamente, estas lesões consistem em focos de infiltração de células mononucleares com reduzidas áreas de necrose (Fig. 10C). As lesões hepáticas consistem em infiltrações de células mononucleares e vários focos de necrose hepatocelular (Fig. 10D), associados a trombos intrasinusais (Barr et al., 1990; Wouda et al., 1997b). Num estudo realizado por Collantes-Fernández et al., (2006), a hepatite periportal foi mais grave em abortos de carácter epidémico quando comparada com abortos de carácter endémico. Estes mesmos autores compararam a carga parasitária com a gravidade das lesões entre fetos provenientes de abortos epidémicos e de abortos endémicos, e entre fetos abortados em diferentes fases da gestação. A conclusão a que chegaram foi que as lesões e a carga parasitária no coração, cérebro, pulmões e fígado dos fetos oriundos de abortos epidémicos eram mais acentuadas que nos fetos oriundos de abortos endémicos. A fase da gestação em que ocorreu o aborto também teve influência na gravidade das lesões e na carga parasitária, sendo estas mais graves em fetos abortados durante o primeiro e segundo trimestre de gestação (Collantes-Fernández et al., 2006).

As lesões placentárias encontram-se frequentemente confinadas aos cotilédones fetais, e consistem em áreas focais de necrose com inflamação não supurativa, também é possível verificar-se a presença de taquizoítos nos trofoblastos (Shivaprasad et al., 1989; Barr et al., 1990, 1991b; Otter et al., 1995; Bergeron et al., 2001b), e noutros casos pode-se observar placentite multifocal coalescente (Macaldowie et al., 2004; Maley et al., 2006; Gibney et al., 2008; Rojo-Montejo et al., 2009; Caspe et al., 2012).

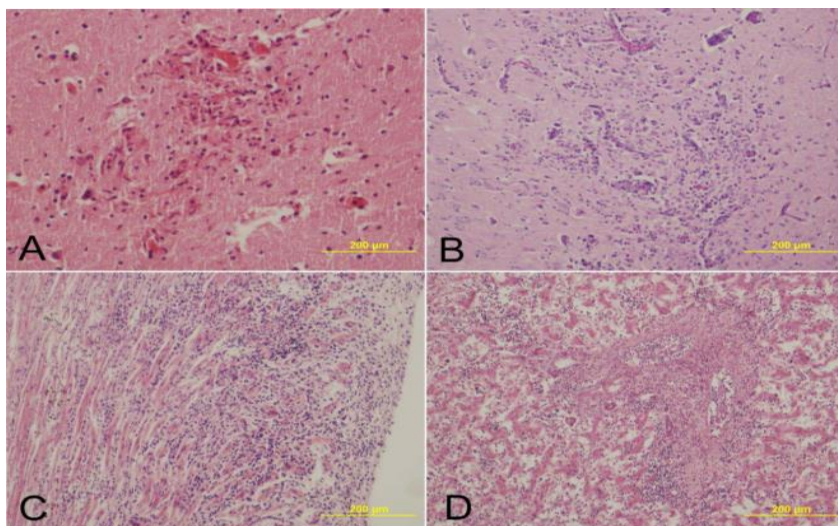


Figura 10. Lesões tipicamente associadas à infecção por *N. caninum* encontradas em fetos bovinos. H&E. **(A)** Necrose focal e infiltrado de células mononucleares no cérebro de um feto. **(B)** Gliose, infiltrados perivascularares de células mononucleares, e neovascularização num vitelo de três dias. **(C)** Epimiocardite difusa no coração de um feto abortado. **(D)** Hepatite caracterizada por um infiltrado de células mononucleares no parênquima, em especial na área periportal. (Dubey et al., (2006))

### 2.7.2.2. Vitelos neonatos

São poucos os vitelos infetados congenitamente que apresentam sinais clínicos. Como tal, torna-se difícil encontrar histologicamente *N. caninum*, mesmo em vitelos com doença clínica. Num estudo realizado por De Meerschman et al., (2005), a presença de *N. caninum* em cortes histopatológicos, foi apenas observada num vitelo, num grupo de seis vitelos que apresentavam sinais neurológicos e anticorpos anti-*Neospora* à nascença. A encefalomielite foi a lesão predominante nos vitelos, que nasceram vivos, mas afetados clinicamente, ou que acabaram por desenvolver doença clínica algum tempo após o nascimento, tendo sido necropsiados às duas semanas de vida (O'Toole e Jeffrey, 1987; Parish et al., 1987; Dubey et al., 1989; Barr et al., 1991b; Dubey et al., 1992b; Barr et al., 1993; Dubey e Lindsay, 1996; Anderson et al., 1997; Magnino et al., 1999; Peters et al., 2001; De Meerschman et al., 2005).

### 2.7.2.3. Bovinos adultos

*N. caninum* ainda não foi identificado em cortes histológicos corados de tecidos de bovinos com idade superior a dois meses. Assim sendo, a especificidade das lesões associadas a *N. caninum* não estão definidas. Sawada et al., (2000) reportaram gliose e alargamento da área perivascular no SNC, miocardite e miosite focal, e infiltrados de células mononucleares no fígado e rim de uma vaca, na qual foi isolado *N. caninum*. Também Okeoma et al., (2004) conseguiram isolar com sucesso *N. caninum* no tecido cerebral de uma vaca adulta infetada naturalmente.

### 2.7.3. Imuno-histoquímica (IHQ)

A imuno-histoquímica consiste num conjunto de processos em que são utilizados anticorpos como reagentes capazes de reconhecer e formar uma ligação, de forma específica,

com constituintes dos tecidos de cujos anticorpos, são antigénios (Ferro, 2014). Esta ligação possibilita localizar e identificar várias substâncias presentes a nível celular e tecidual através da sua coloração, que se deve à formação de complexos imunes resultando na precipitação de um cromogénio (Polak e Van Noorden, 2003).

A coloração imuno-histoquímica constitui um método muito mais fiável e específico para demonstrar a presença de *N. caninum* nas lesões encontradas que a coloração convencional com hematoxilina e eosina, sendo recomendada a realização desta técnica em todos os tecidos que exibam lesões, para avaliar a presença de *N. caninum* (Lindsay e Dubey, 1989b; Boger e Hattel, 2003; Dubey e Schares, 2006). Anticorpos policlonais e monoclonais específicos para *N. caninum* podem ser usados (Lindsay e Dubey, 1989b; Cole et al., 1994), sendo que ambos se encontram disponíveis comercialmente. Anticorpos policlonais obtidos em coelhos parecem ser mais fiáveis que anticorpos monoclonais obtidos em ratos para fins diagnósticos (Dubey e Schares, 2006). Segundo Anderson et al., (1991) e Canada et al., (2002a), a existência de reações cruzadas dos anticorpos anti-*N. caninum* com outros protozoários (*T. gondii* e *Sarcocystis* spp.), não representa um grande problema uma vez que estes parasitas raramente provocam aborto em bovinos. No entanto, mesmo tendo uma elevada especificidade, numa comparação entre protocolos imunohistoquímicos de diferentes laboratórios, foram encontrados vários casos de falsos-positivos para *N. caninum* em tecidos de animais infetados por *T. gondii* (van Maanen et al., 2004). Além disso, esta técnica é relativamente pouco sensível na deteção de formas parasitárias em fetos bastante autolisados (De Meerschman et al., 2005; Ortega-Mora et al., 2006; Regidor-Cerrillo et al., 2014).

Frequentemente, não se conseguem distinguir grupos de taquizoítos de quistos tecidulares com base nas técnicas imunohistoquímicas, a não ser que se usem anticorpos específicos para bradizoítos (M. McAllister et al., 1996). Tecidos com grande concentração de peroxidase, em especial a placenta, devem ser previamente tratados com tripsina ou pepsina (Dubey et al., 2001a). O diagnóstico só deve ser feito em situações que se observam os contornos do parasita, uma vez que em casos que apenas se observa uma coloração difusa os achados podem não ser específicos (Dubey e Schares, 2006).

Por imuno-histoquímica, *N. caninum* é frequentemente demonstrado em amostras de tecido cerebral e cardíaco, podendo também ser visualizado, de forma menos frequente, em outros órgãos, incluído a placenta (Dubey e Schares, 2006). Num estudo feito por Wouda et al., (1997), *N. caninum* foi encontrado em 68 amostras de cérebro (85%), 11 de coração (14%) e 21 no fígado (26%), num total de 80 fetos abortados. Os autores deste estudo também verificaram uma maior presença de *N. caninum* em casos de abortos epidémicos. Ocasionalmente, *N. caninum* poderá ser apenas encontrado em tecidos extraneurais (Boger e Hattel, 2003) e, por vezes, o número de quistos celulares a nível cerebral poderá ser diminuto, podendo não estar associados a uma resposta celular (Ortega-Mora et al., 2006).

## 2.7.4. Diagnóstico Serológico

Os testes serológicos possuem a vantagem de poderem ser aplicados *ante-mortem* e de conseguirem fornecer informações acerca da fase em que a infecção se encontra. Em vitelos ou bovinos adultos, alguns dias após a infecção primária dá-se a formação de anticorpos anti-*N. caninum* específicos (IgM e IgG). Enquanto os níveis de IgM específicas atingem o seu pico duas semanas após a infecção e depois descem abaixo do limiar de detecção do teste de aglutinação direta para *Neospora* (NAT) quatro semanas após a infecção (De Marez et al., 1999), os níveis de IgG vão aumentando desde as primeiras semanas até aos três a seis meses após a infecção primária (Conrad et al., 1993b; Dubey et al., 1996a; Uggla et al., 1998; De Marez et al., 1999; Schares et al., 1999, 2000; Williams et al., 2000; Trees et al., 2002). Após uma infecção primária (induzida por taquizoítos ou pela ingestão de oocistos), verifica-se que o aumento inicial da IgG<sub>1</sub> específica é seguido por um aumento, ligeiramente retardado, da IgG<sub>2</sub> específica (De Marez et al., 1999; Williams et al., 2000; Andrianarivo et al., 2001). Num estudo feito em bezerros infetados experimentalmente através de oocistos, não se observaram níveis de IgA elevados (De Marez et al., 1999). Os níveis de anticorpos específicos podem persistir por toda a vida, no entanto podem ocorrer flutuações dos níveis destes, podendo inclusive encontrar-se em valores abaixo do limiar de detecção dos testes serológicos (Dubey e Schares, 2006).

Depois da infecção primária por *N. caninum*, a avidéz dos anticorpos específicos (IgG) aumenta ao longo do tempo (Björkman et al., 2003, 1999), assim sendo, os testes de avidéz fornecem informações importantes que permitem discriminar qual a fase de infecção em que o animal se encontra (Schaes et al., 2002), além disso poderão servir de complemento aos ensaios de IgG em estudos epidemiológicos da infecção por *N. caninum* (Björkman et al., 2003). Diversos estudos de avidéz foram desenvolvidos com objetivo de diferenciar uma resposta de baixa avidéz da IgG (indicativo de uma infecção recente, ocorrida há cerca de dois meses) de uma resposta de alta avidéz da IgG (indicativo de infecção crónica). Usualmente a obtenção de respostas de alta avidéz da IgG são observadas em bovinos infetados por mais de seis meses (Björkman et al., 2003, 1999). Em estudos feitos em condições de campo, foi colocada a hipótese de que uma resposta de baixa avidéz da IgG poderia estar associada a uma situação de abortos epidémicos associados a *N. caninum*, indicando que os abortos foram provocados por uma infecção primária recente (Jenkins et al., 2000; McAllister et al., 2000; Schares et al., 2002; Sager et al., 2005).

### 2.7.4.1. Testes serológicos

Foram desenvolvidos diversos testes serológicos para detecção de anticorpos anti-*N. caninum* em bovinos, como os testes de aglutinação direta modificados para *Neospora* spp. (NAT) (Packham et al., 1998; Romand et al., 1998), técnica de imunofluorescência indireta (IFAT) (Conrad et al., 1993b; Buxton et al., 1997; Schares et al., 1998), ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) convencional (Dubey et al., 1996a; Williams et al., 1997; Wouda et al., 1998a; Gottstein et al., 1999; Schares et al., 1999), ELISA de avidéz (Björkman et al., 1999; Schares et

al., 2002; Sager et al., 2003), ELISA em leite de tanque (Björkman et al., 1997; Schares et al., 2003; Bartels et al., 2005), *Immunoblotting* (Bjerkas et al., 1994; Aguado-Martínez et al., 2005) e teste imunocromatográfico rápido (ICT) (Liao et al., 2005).

No entanto, apesar de existirem diversos testes serológicos, não existe um teste de referência que defina um animal verdadeiramente positivo ou um animal verdadeiramente negativo, apesar de se utilizar o IFAT com essa finalidade (Ortega-Mora et al., 2006). O que muitos laboratórios fazem para comparar o desempenho dos testes serológicos usados, é utilizar a decisão da “maioria dos testes” como definição de *gold standart*, ou seja, amostras classificadas como positivas ou negativas pela maioria dos testes, foram consideradas como amostras positivas e negativas de referência (Alvarez-García et al., 2013; Campero et al., 2015; Guido et al., 2016).

#### 2.7.4.2. Imunofluorescência indireta (IFAT)

A técnica de imunofluorescência indireta (IFAT) foi a primeira a ser aplicada no diagnóstico de neosporose (Dubey et al., 1988b) e foi a técnica serológica mais utilizada para diagnosticar a infecção por *N. caninum* em cães e bovinos, num passado recente (Conrad et al., 1993b; Otter et al., 1997; Atkinson et al., 2000), além disso continua a servir como teste de referência para as outras técnicas (Björkman e Ugglá, 1999; Dubey, 2003; Piagentini et al., 2012). A IFAT é uma técnica serológica que se baseia na fixação de taquizoítos intactos em lâminas de microscópio seguido da incubação com os soros a testar, e posterior detecção de anticorpos anti-*N. caninum*, com recurso a anticorpos anti-espécie a testar, marcados com fluoresceína (Björkman e Ugglá, 1999; Ortega-Mora et al., 2006). Uma IFAT é considerada positiva (Fig. 11) quando toda a membrana íntegra dos taquizoítos apresenta fluorescência periférica (Paré et al., 1995), o que ocorre com titulações moderadas a elevadas. Quando são testados soros com titulações baixas, geralmente verifica-se fluorescência na zona apical ou uma redução da intensidade desta (Conrad et al., 1993b; Paré et al., 1995), no entanto estes achados também são observados em situações de reações cruzadas com *T. gondii* (Atkinson et al., 2000).

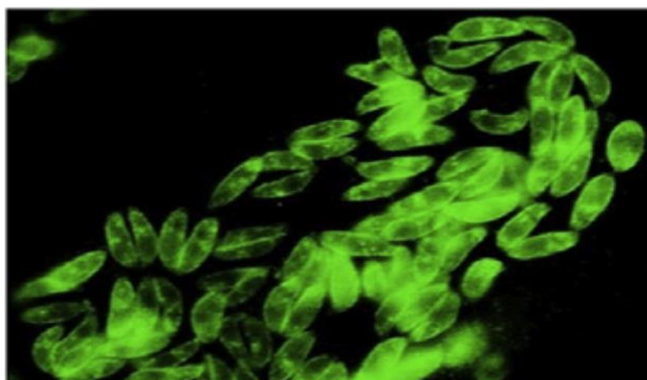


Figura 11. IFAT positiva para *Neospora caninum*. (McAllister, (2016)).

O valor dos títulos do limiar de positividade para bovinos, variam entre laboratórios desde 1:100 até 1:640 para adultos e desde 1:16 até 1:80 para serologia fetal (Björkman e Ugglá,

1999; Alvarez-García et al., 2003). No entanto, von Blumröder et al., (2004) recomenda, para detecção da infeção em bovinos, um valor do limiar de positividade de 1:200, e Alvarez-García et al., (2003) um valor do limiar de positividade de 1:16 a 1:25 em fluídos fetais. Este teste, comparado por exemplo ao teste ELISA, tem como desvantagens o facto de necessitar de uma pessoa treinada e experiente para a sua execução, ser uma técnica de execução lenta que não permite a análise de um grande número de amostras em simultâneo, e os resultados dependem da subjetividade de quem os lê (Ortega-Mora et al., 2006; Risco-Castillo et al., 2011), por estas razões esta técnica não é utilizada por rotina para o rastreio da infeção por *N. caninum* em explorações de bovinos (Haddad et al., 2005).

### **2.7.4.3. Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA)**

O teste imunoenzimático ELISA, constitui um dos principais métodos serológicos utilizados para a detecção de anticorpos anti-*N. caninum* (IgG), no soro e leite individual ou de tanque (Ortega-Mora et al., 2006; Dubey et al., 2007) e, mais recentemente, no líquido cefalorraquidiano (Uesaka et al., 2018), no entanto é possível a ocorrência de resultados inconclusivos (Dubey e Lindsay, 1996), não existindo testes de referência que definam o que é um resultado negativo ou um resultado positivo (Ortega-Mora et al., 2006).

Estes testes apresentam como vantagens, comparativamente à IFAT, o facto de ser um processo que se torna rapidamente automatizado, permite a análise de um grande número de amostras de forma rápida, e permite o registo objetivo dos resultados (Ortega-Mora et al., 2006). Foram desenvolvidas diferentes variações do teste ELISA, como o ELISA indireto e ELISA de competição (cELISA). Além disso, foram usadas diferentes preparações de antigénios, mas a preparação usada no ELISA indireto consiste em antigénios de taquizoítos solúveis, permitindo assim o uso deste teste em soro e leite de bovinos (Ortega-Mora et al., 2006). Os resultados do teste ELISA indireto podem ser expressos em densidade ótica (DO) (Osawa et al., 1998), percentagem de positividade (PP) (Williams et al., 1999), índice relativo percentual (IRCP) (Alvarez-García et al., 2003) ou rácio amostra/controlo positivo (S/P) (Wouda et al., 1998a). No cELISA, anticorpos anti-*N. caninum* específicos competem por um epítopo no antigénio p65 com um anticorpo monoclonal conjugado, o resultado é expresso em percentagem de inibição (Baszler et al., 1996).

Nos testes serológicos, os resultados são dependentes de diversos fatores como: a composição antigénica, as características do conjugado e outros reagentes (Björkman e Uggla, 1999). A idade e o motivo pela qual se está a testar (detecção de infeção ou causa de aborto) também têm uma grande influência na seleção do valor do limiar de positividade (Atkinson et al., 2000; Alvarez-García et al., 2003). De um ponto de vista prático e na ausência de um valor limiar de positividade perfeito para bovinos reprodutores, o uso de um valor do limiar de positividade padrão que permita a obtenção da máxima sensibilidade será o mais adequado quando o objetivo é testar os animais antes da sua compra ou antes da sua entrada num lote livre de *N. caninum*, por outro lado quando o objetivo é decidir quais os animais a refugar deve-se utilizar um valor do

limiar de positividade que confira a máxima especificidade. Em certos casos, o uso de *Immunoblotting* poderá ser recomendado como teste confirmatório ou teste *a posteriori* (Bartels et al., 2006a).

Num estudo multicêntrico levado a cabo em vários laboratórios europeus, diferentes ELISA e IFAT foram comparados (von Blumröder et al., 2004). A maioria das técnicas mostraram um elevado nível de concordância na interpretação dos resultados (positivos e negativos). Além disso, observou-se um aumento da concordância entre os testes após a aplicação de valores do limiar de positividade padrão, permitindo assim padronizar a interpretação dos resultados obtidos em diferentes testes, usados em estudos epidemiológicos paralelos (Ortega-Mora et al., 2006).

A prova ELISA indireto para deteção de *N. caninum* foi modificada de modo a permitir a avaliação da avidéz das IgG permitindo a distinção entre infeção recente ou crónica por este agente (Björkman et al., 1999; Maley et al., 2001; Schares et al., 2002; Sager et al., 2003; Aguado-Martínez et al., 2005; Dubey e Schares, 2011). Os testes de avidéz baseiam-se no facto de que os primeiros anticorpos sintetizados, após a infeção primária, têm uma menor afinidade que aqueles produzidos mais tarde. Posto isto, valores de avidéz baixos estão associados a infeções recentes, e valores de avidéz altos estão relacionados com infeções de carácter mais crónico (Jenkins et al., 2000; Schares et al., 2002; Björkman et al., 2003; Aguado-Martínez et al., 2005; Björkman et al., 2006; Basso et al., 2010).

A deteção de anticorpos por ELISA também pode ser feita através de amostras de leite individual ou de leite de tanque (Ortega-Mora et al., 2006). Esta forma de deteção de anticorpos implica poucos custos e as amostras podem ser colhidas facilmente de forma não invasiva e sem grande manipulação do animal. Foram conduzidos diversos trabalhos com recurso a amostras de leite individual usando diferentes testes ELISA com um grau de concordância satisfatório entre os resultados obtidos com soro e com leite (Björkman et al., 1997; Moskwa et al., 2003; Schares et al., 2004a).

Também é possível realizar a deteção de anticorpos por ELISA em amostras de leite de tanque (Chanlun et al., 2002; Schares et al., 2003; Chanlun et al., 2006; Frössling et al., 2006; Varcasia et al., 2006) sempre que a prevalência da infeção por este parasita seja superior a 10-15%. Além disso, este tipo de análise pode ser usada para monitorizar programas de controlo de neosporose. Bartels et al., (2005) compararam diversos testes ELISA usando amostras de leite de tanque, tendo observado que os dois testes comerciais avaliados eram capazes de detetar valores de prevalência de *N. caninum* acima de 15% nos animais em lactação.

#### **2.7.4.4. Immunoblotting**

A técnica de *Immunoblotting*, também conhecida por *Western blot*, combina a revelação em membrana, das proteínas que migraram em gel, por eletroforese, com a especificidade da deteção imunológica, permitindo assim obter uma grande sensibilidade e especificidade, no entanto esta técnica, por necessitar de uma pessoa experiente para a sua realização, ser muito morosa, e necessitar de equipamento especializado (Campero et al., 2015) não é usada como



técnica de rotina para a análise serológica em bovinos, uma vez que não permite a análise de muitas amostras em simultâneo (Ortega-Mora et al., 2006; Ghalmi et al., 2014). Em vez disso, esta técnica tem sido usada para identificação de antigénios imunodominantes de taquizoítos no soro de hospedeiros (Bjerkas et al., 1994; Baszler et al., 1996; Alvarez-García et al., 2002) e como teste confirmatório após a obtenção de resultados duvidosos depois da realização de outros testes serológicos (Schaes et al., 1998, 1999; Atkinson et al., 2000; Alvarez-García et al., 2003; Bartels et al., 2006a; Campero et al., 2015), além de fornecer informações adicionais como o peso molecular dos antigénios reativos e o possível interesse destes, quer para diagnóstico, quer para a imunidade em trabalhos no desenvolvimento de vacinas (Ghalmi et al., 2014).

#### **2.7.4.5. Teste de Aglutinação Direta modificado para *Neospora* spp. (NAT)**

A técnica de NAT, baseia-se no princípio de que os taquizoítos intactos aglutinam-se na presença de anticorpos IgG específicos (Packham et al., 1998; Romand et al., 1998; Canada et al., 2004; Dubey e Thulliez, 2005). Segundo Packham et al., (1998), a utilização de um valor do limiar de positividade de 1:80 permite obter uma sensibilidade de 100% e uma especificidade de 97%. As vantagens desta técnica centram-se na simplicidade de execução e no facto de não requerer o uso de conjugados específicos da espécie em análise (Ortega-Mora et al., 2006), o que torna este teste adequado para espécies silvestres (Almería, 2013; Donahoe et al., 2015). No entanto, este teste apresenta menor especificidade (alguns falsos-positivos) o que constitui uma grande desvantagem (Ortega-Mora et al., 2006; Moraveji et al., 2012).

Atualmente, existem diversos *kits* comerciais de ELISA, IFAT e NAT disponíveis para o diagnóstico de neosporose (Björkman e Uggla, 1999; Williams et al., 1999; Atkinson et al., 2000; Baszler et al., 2001; Reichel e Pfeiffer, 2002; Dubey e Schaes, 2006; Alvarez-García et al., 2013). No entanto, os elevados custos, os diversos processos de importação envolvidos e a necessidade de possuir um espectrofotómetro para placas multipoços, constituem uma barreira à aquisição destes *kits* por parte de muitas explorações de bovinos e de laboratórios com menos condições em certos países (Ghalmi et al., 2014; Campero et al., 2018).

Liao et al., (2005) desenvolveram um teste de imunocromatográfico rápido (ICT) utilizando um antigénio de superfície recombinante de *N. caninum* (NcSAG1), de modo a permitir uma rápida deteção de anticorpos anti-*N. caninum* em bovinos.

#### **2.7.4.6. Serologia Fetal**

A demonstração de anticorpos anti-*N. caninum* no soro ou fluídos fetais por IFAT, ELISA ou *Immunoblotting* é indicativa de infeção fetal (Conrad et al., 1993b; Barr et al., 1995; Paré et al., 1995; Otter et al., 1997; Slotved et al., 1999; Söndgen et al., 2001), uma vez que, nos bovinos, não existe qualquer transferência de imunidade passiva da mãe para o feto durante a gestação. O feto bovino apenas tem capacidade para produzir anticorpos a partir do quinto mês de gestação. Assim sendo, a serologia fetal apenas pode ser usada no diagnóstico da infeção por *N. caninum* em fetos com idade superior a cinco meses (Pereira-Bueno et al., 2003). No entanto,

vários trabalhos mostram que, mesmo com a utilização de *Immunoblotting*, a serologia fetal apresenta uma baixa sensibilidade, correspondendo a um aumento de falsos negativos, de forma a minimizar este problema, opta-se por baixar a diluição utilizada como limiar de positividade (Barr et al., 1995; Wouda et al., 1997a; Gottstein et al., 1999; Slotved et al., 1999; Söndgen et al., 2001). A falta de imunocompetência fetal (Wouda et al., 1997a), um curto intervalo entre a infecção e morte fetal (Söndgen et al., 2001), e a autólise, que pode causar a degradação das imunoglobulinas fetais e consecutivamente baixos níveis de anticorpos específicos para *N. caninum* (Wouda et al., 1997a), poderão ser as razões responsáveis por provocar uma baixa sensibilidade da serologia fetal (Ortega-Mora et al., 2006). Por outro lado, a deteção de anticorpos anti-*N. caninum* em fluídos fetais não prova necessariamente que a infecção por este agente causou a morte fetal, uma vez que muitos vitelos infetados congenitamente e clinicamente normais têm anticorpos anti-*N. caninum*. Portanto, a serologia fetal não deverá ser utilizada como único meio de diagnóstico na confirmação da infecção por *N. caninum*, em casos isolados de abortos (Ortega-Mora et al., 2006).

#### **2.7.4.7. Outros testes para diagnóstico *in vivo***

Atualmente, existem outros meios de diagnóstico que podem ser usados para diagnóstico *in vivo* de *N. caninum*, apesar da maior parte destes ser usado para trabalhos de investigação e necessitar de validação com as técnicas usadas mais frequentemente. O uso de um *nested-PCR* (nPCR) permite a deteção de ADN parasitário no sangue (Okeoma et al., 2004; Ferre et al., 2005) e no sémen (Ortega-Mora et al., 2003; Caetano-da-Silva et al., 2004; Ferre et al., 2005), podendo ser posteriormente quantificado por um PCR em tempo real (RT-PCR) no sangue (Okeoma et al., 2005), bem como no sémen (Ortega-Mora et al., 2003; Caetano-da-Silva et al., 2004; Ferre et al., 2005). Já foi encontrado ADN parasitário, de forma esporádica, em leucócitos de animais infetados naturalmente e experimentalmente. Nestes animais foi também encontrado ADN parasitário na fração celular do sémen com baixa carga parasitária.

Por outro lado, a determinação da produção de IFN- $\gamma$  específico permite uma quantificação indireta da resposta mediada por células do animal. Os linfócitos, provenientes do sangue periférico de animais infetados com *N. caninum*, irão proliferar *in vitro* quando estimulados por antígenos específicos, tendo sido retirado IFN- $\gamma$  do sobrenadante destas culturas. Futuramente, esta determinação poderá vir a ser utilizada para diagnóstico de neosporose mas, por enquanto, este método é apenas usado para investigação (Andrianarivo et al., 2001; Almeria et al., 2003; Ferre et al., 2005; Moore et al., 2005; Serrano et al., 2006).

#### **2.7.4.8. Deteção de *N. caninum***

Outrora a IHQ foi o método mais utilizado para a deteção deste parasita no tecido cerebral fetal e noutros tecidos como os pulmões, fígado e coração (Lindsay e Dubey, 1989b). No entanto, a IHQ é uma técnica com uma sensibilidade relativamente baixa para a deteção de formas parasitárias em fetos muito autolisados. Uma das vantagens desta técnica reside na sua

alta especificidade, apesar de já terem sido reportados alguns casos de reação cruzada com *T. gondii* (van Maanen et al., 2004). A demonstração de antígenos de *Neospora* spp. por IHQ depende do número de cortes histológicos feitos e do tempo passado em examinação ao microscópio (Wouda et al., 1997b). Os taquizoítos e antígenos deste parasita são tipicamente encontrados em lesões cerebrais, podendo também ser encontrados em lesões no coração e fígado (González et al., 1999). O número de quistos tecidulares encontrados a nível cerebral geralmente é baixo, não estando associados a respostas celulares (Fig. 12).



Figura 12. Quisto tecidular de *N. caninum*, localizado num neurónio, evidenciado por IHQ com recurso a soro de coelho policlonal anti-*N. caninum*. Contramarcação com H&E (x400). (Ortega-Mora et al., (2006))

O uso das técnicas de PCR tem sido muito útil como meio de diagnóstico para a deteção de *N. caninum* em fetos abortados de bovino (Sager et al., 2001; Pereira-Bueno et al., 2003; van Maanen et al., 2004; Medina et al., 2006). Este meio de diagnóstico apresenta uma sensibilidade e especificidade superior aos métodos de IHQ (van Maanen et al., 2004). Nos últimos anos, várias técnicas de PCR foram desenvolvidas de modo a permitir a amplificação da região ITS1 do parasita (Holmdahl e Mattsson, 1996) e da sequência Nc5 específica para *Neospora* spp. (Müller et al., 1996), com diferentes modificações do PCR convencional, como o nPCR, para aumentar a sensibilidade e especificidade da técnica. Não obstante, segundo van Maanen et al., (2004) não existem diferenças significativas entre os diferentes formatos de PCR (PCR convencional ou nPCR) e a sensibilidade de diagnóstico. As vantagens da técnica de PCR assentam na sua grande especificidade e sensibilidade, na sua rapidez, e na sua capacidade de amplificar pequenas quantidades de ADN de *Neospora* spp. em grandes amostras. Além disso, o PCR também funciona bem com fetos autolisados (Ortega-Mora et al., 2006).

Foi descrito por Löschenberger et al., (2004), uma nova forma de detetar *N. caninum* com recurso ao PCR *in situ*. Esta técnica combina as vantagens do PCR convencional (alta sensibilidade e especificidade) com a representação *in situ* das técnicas de IHQ. Além disso,

como demonstrado pelos autores, não se verificaram reações cruzadas com *T. gondii*, uma vez que os controlos deste teste contendo tecidos infetados com *T. gondii* tiveram sempre resultados negativos (Löschenberger et al., 2004).

#### **2.7.4.9. Coprologia**

O exame coprológico, *per se*, tem pouca importância no diagnóstico de infeção por *N. caninum* (Andreotti et al., 2003), porém é usado como forma de averiguar se determinado animal está a eliminar oocistos nas fezes, e é fundamental na identificação de espécies que são hospedeiras definitivas para *N. caninum*, tendo assim um papel importante na epidemiologia da neosporose (Dubey et al., 2007). Para tal, utiliza-se uma combinação de um método de sedimentação (1600 G por 10 min) seguido de flutuação com recurso a uma solução saturada com sacarose, com gravidade específica de 1,3 [550 g de sacarose em 450 mililitros (mL) de água], após conclusão adiciona-se dicromato de potássio ( $K_2Cr_2O_7$ ) a 1-2%, para promover a esporulação e evitar o crescimento de bactérias e fungos. Deixando depois os oocistos expostos ao ar e à temperatura ambiente entre 72 a 96h, e depois refrigeram-se a 4°C. Para a contagem de oocistos, utiliza-se uma câmara de contagem de *Neubauer* (Schaes et al., 2005).

Uma vez que o período de eliminação de oocistos de *N. caninum* é geralmente breve, estes são encontrados de forma pouco frequente nas fezes dos canídeos (McAllister, 2016), e devido ao facto de estes apresentarem uma morfologia muito semelhante à de outros parasitas do Filo Apicomplexa, que também parasitam estes animais, em especial *Hammondia heydorni*, a avaliação morfológica dos oocistos eliminados nas fezes não é considerada uma técnica adequada para a identificação das espécies envolvidas, carecendo de avaliação molecular (Reichel et al., 2007).

#### **2.7.4.10. Isolamento de *N. caninum***

O isolamento de *N. caninum* em culturas celulares e/ou em bioensaios através da sua inoculação em estirpes de murganhos (*Mus musculus*) imunodeprimidos não constitui uma técnica adequada para um diagnóstico rotineiro da causa de aborto, uma vez que o sucesso do isolamento é prejudicado pelo facto de que a maior parte das formas parasitárias em fetos bovinos morrem durante a autólise celular (Dubey, 1999). No entanto, estas técnicas podem ser usadas para a obtenção de novos isolados de *Neospora* spp., permitindo continuar os trabalhos de investigação, como epidemiologia molecular, estudos de patogenicidade e desenvolvimento de vacinas (Ortega-Mora et al., 2006).

### **2.8. Fatores de risco da neosporose bovina**

O conhecimento dos fatores de risco que podem favorecer a infeção por *N. caninum* e a ocorrência de abortos provocados por este agente são de extrema importância para o desenvolvimento e implementação de medidas para controlar a neosporose bovina. Existem vários trabalhos que avaliam os fatores de risco, quer a nível individual quer a nível da manada, da ocorrência de infeção por *N. caninum* ou de episódios de aborto associados a este parasita.

Segundo Dubey et al., (2007), estes riscos, referidos anteriormente, estão positivamente relacionados uns com os outros apesar de serem influenciados de uma maneira distinta (Fig. 13).

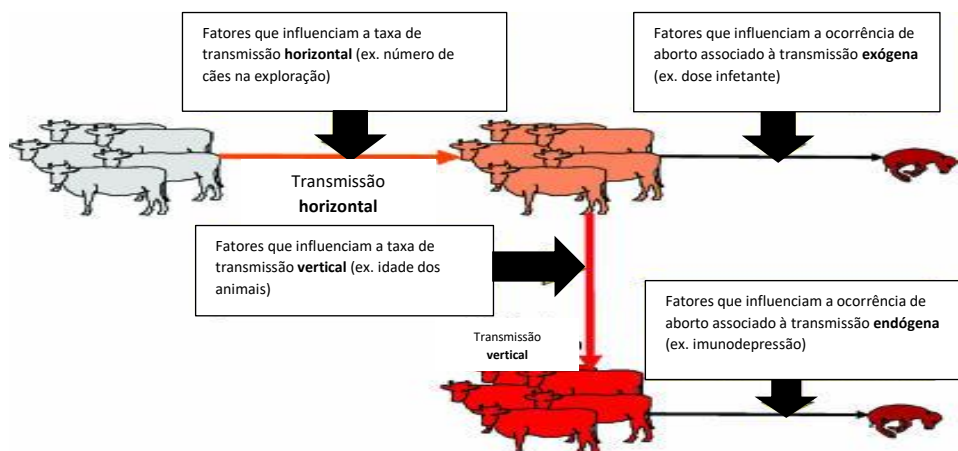


Figura 13. Visão geral dos potenciais fatores de risco ou proteção que influenciam a transmissão horizontal ou vertical de *N. caninum* bem como a ocorrência de aborto exógeno ou endógeno associado a este. Neste diagrama, os animais naif encontram-se com a cor cinza, os animais com infecção pós-natal estão representados a laranja e os animais infetados verticalmente encontram-se a vermelho. Adaptado de Dubey et al., (2007)

Após a ocorrência de transmissão transplacentária exógena, o risco de aborto pode vir a ser influenciado, por exemplo, pelo número de oocistos ingeridos pela mãe e pela fase da gestação (Gondim et al., 2004a), ao passo que a ocorrência de abortos por transmissão transplacentária endógena pode ser influenciada por diversos fatores, como o estado imunológico da mãe, e por outros mecanismos que ainda hoje não estão bem elucidados (Dubey et al., 2007).

A proporção entre a ocorrência de transmissão horizontal em relação à ocorrência de transmissão vertical numa exploração ou numa região, depende fortemente da prevalência de infecção na população bovina, bem como a distribuição de cães infetados (e outros canídeos silvestres) pela região, tal como o acesso destes aos bovinos, alimentos e parques de alimentação (Haddad et al., 2005; Blumröder et al., 2006). Certos estudos evidenciam a influência da presença de cães nas explorações com os níveis de prevalência de *N. caninum* nos bovinos (Bartels et al., 1999; Ould-Amrouche et al., 1999; Wouda et al., 1999b; Th Dijkstra et al., 2002b), no entanto existem outros estudos em que esta relação não foi demonstrada (Mainar-Jaime et al., 1999; Romero et al., 2002). Foram realizados inúmeros estudos epidemiológicos de modo a avaliar o risco de infecção por *N. caninum* a nível individual e a nível de manada com o estado serológico dos animais como variáveis dependentes, estes estão resumidos no Anexo 1.

## 2.8.1. Risco de Infecção

### 2.8.1.1. Idade

O risco de um animal ser seropositivo aumenta com a idade ou com o aumento do número de partos, em bovinos de carne e de leite (Jensen et al., 1999; Dyer et al., 2000;

Sanderson et al., 2000; Rinaldi et al., 2005), sugerindo que a transmissão horizontal de *N. caninum* é a via de transmissão mais frequente em certas explorações. Waldner et al., (1998) verificaram que a idade exerce um efeito negativo na prevalência de animais positivos numa exploração leiteira no Canadá. Neste mesmo estudo foi observado que o risco de um animal ser refugado era significativamente maior em vacas seropositivas do que em vacas seronegativas, sugerindo que o refugo seletivo poderá ser a razão da obtenção destes resultados em relação à idade dos animais (Dubey et al., 2007). Posteriormente, num estudo europeu, observou-se que a influência da idade na seropositividade de bovinos de leite pode variar consoante as áreas em estudo. Em Espanha, por exemplo, o risco de um animal ser seropositivo aumenta com a idade, ao passo que na Suécia verifica-se o oposto (Bartels et al., 2006a). Coloca-se a hipótese de que o efeito da idade pode ser influenciado por variações na probabilidade de transmissão horizontal, como o risco de ingestão de oocistos, por diferenças regionais na taxa de substituição, influenciando o tempo que os animais podem estar expostos à transmissão horizontal, e por práticas de gestão como o refugo seletivo de animais positivos (Bartels et al., 2006a). O refugo de animais não seletivo, numa manada com elevada prevalência de infeção por *N. caninum*, pode resultar numa associação positiva entre a idade e a prevalência, nos casos em que as novilhas de substituição são adquiridas em explorações com baixa prevalência de infeção por este agente. Este efeito é mais notório pelo facto de que a proporção de transmissão vertical é muito menor que 100% (Davison et al., 1999b).

Um estudo britânico, em explorações de leite com problemas associados à infeção por *N. caninum*, revelou uma prevalência significativamente menor em animais dos 13 aos 24 meses de idade, que em animais dos sete aos 12 meses e que os animais com idade superior a 24 meses (Davison et al., 1999a). Foi então colocada a questão sobre a possibilidade de alguns dos animais com idades compreendidas entre os 13 e os 24 meses (provavelmente novilhas) terem sido infetados congenitamente com *N. caninum*, apesar de serem seronegativos. O fenómeno de recrudescência da infeção durante a gestação pode ter sido responsável pelo aumento da prevalência da doença nas faixas etárias mais velhas (Davison et al., 1999a).

### **2.8.1.2. Hospedeiros definitivos (cães, coiotes e outros canídeos)**

Na maior parte dos estudos epidemiológicos, em explorações de leite, a presença de cães nas explorações, no presente ou nos últimos dez anos (Paré et al., 1998; Blumröder et al., 2006), e o número de cães presentes na exploração (Paré et al., 1998; Mainar-Jaime et al., 1999; Schares et al., 2004b; Blumröder et al., 2006; Corbellini et al., 2006) são considerados fatores de risco para a infeção por *N. caninum* em bovinos. Este facto era esperado, uma vez que os cães são hospedeiros definitivos deste agente, além disso foram estudadas as formas como os cães podem transmitir a infeção aos bovinos (Th Dijkstra et al., 2002a). Em explorações com evidências da ocorrência de infeção pós-natal dos animais, foi referido em maior número de vezes, pelos proprietários que os seus cães defecavam nos corredores de alimentação e junto da silagem de erva ou de milho, em comparação com os proprietários de outras explorações sem

grandes problemas (Th Dijkstra et al., 2002a). Num trabalho em explorações com sinais de infecção pós-natal recente, a seropositividade dos animais foi, mais frequentemente, relacionada com o alojamento de bovinos e cães em simultâneo, do que os alimentos, indicando que as infeções devem-se principalmente à ocorrência de contaminação das manjedouras com oocistos, e não devido à contaminação de forragens durante o seu armazenamento (Th Dijkstra et al., 2002b). Em explorações com evidências de infecção pós-natal os proprietários observam frequentemente a ingestão de placentas de bovinos, descargas uterinas, e colostro ou leite, por parte dos cães, com maior frequência do que os proprietários das explorações controlo (Th Dijkstra et al., 2002a), sugerindo que o consumo destes materiais pode representar um risco de infecção para os cães por *N. caninum*. Como referido anteriormente, a ingestão de placentas infetadas foi confirmada como modo de infecção dos H.D., ao contrário da ingestão de colostro (Dijkstra et al., 2001b). No entanto, interessantemente, o consumo de fetos abortados não foi identificado como um potencial fator de risco em manadas com evidências de infecção pós-natal (Th Dijkstra et al., 2002a) e, num trabalho experimental, não foi observada a eliminação de oocistos após a ingestão de fetos abortados e tecido cerebral destes por parte dos cães (Bergeron et al., 2001a). Todavia, os resultados observados neste estudo poderão ter sido influenciados pelo estado de autólise verificado nos fetos, uma vez que este fenómeno ao conduzir à morte celular leva à morte deste parasita. A maior parte das formas parasitárias de *N. caninum*, em fetos abortados, morrem juntamente com as células hospedeiras, sendo raro encontrar bradizoítos intactos (Dubey et al., 2006). Conrad et al., (1993a) conseguiram isolar formas parasitárias viáveis de *N. caninum* em apenas dois de 49 fetos abortados.

Segundo Dijkstra et al., (2002b), a introdução de um novo cão na exploração representa um maior risco de transmissão de *N. caninum* que a presença de um cão já residente. Esta conclusão pode ser explicada fazendo uma analogia com o que se passa com *T. gondii*, uma vez que os H.D., que nunca contactaram com este agente, são cruciais para a continuação do ciclo seu ciclo de vida (Davis e Dubey, 1995). Assim sendo, o mesmo se pode verificar na infecção por *N. caninum* em cães que após a ingestão repetida de tecidos infetados, eliminaram poucos ou mesmo nenhuns oocistos nas fezes (Dijkstra et al., 2001b; Schares et al., 2001a; Gondim et al., 2005). Além disso, Gondim et al., (2005) verificaram que cães mais jovens (dez a 14 semanas de idade) eliminam um maior número de oocistos comparativamente a cães mais velhos (dois a três anos).

Além da existência de cães na exploração, a presença de cães na vizinhança das explorações também constituem um fator de risco para a infecção por este parasita (Dubey et al., 2007). Num estudo realizado na Alemanha por Schares et al., (2003), a densidade populacional canina nos municípios e cidades foi considerada um fator preditor da prevalência da infecção por *N. caninum* em provas ELISA no leite de tanque ou foi identificada como um fator de risco para o aumento da seropositividade da manada (Schaes et al., 2004b; Blumröder et al., 2006).

Em gado de carne, não existem ainda evidências concretas de que a presença de cães na exploração ou a proximidade de cães em redor da exploração sejam um fator de risco para a

infecção por *N. caninum* (Blumröder et al., 2006). Uma possível explicação para isto, reside no facto que nas explorações de carne menos intensivas, não existe um grande contacto dos bovinos com as fezes dos cães (Sanderson et al., 2000; Barling et al., 2001; Otranto et al., 2003). Além disso, Barling et al., (2001) observaram que a presença de um cão da exploração, em explorações de carne no Texas, constitui um suposto fator de proteção, possivelmente devido ao facto de existirem muitos canídeos selvagens na região onde foi feito este estudo e uma vez que, segundo Hobson et al., (2005), a presença de cães da exploração está inversamente relacionada com a presença de canídeos selvagens nos terrenos desta.

### **2.8.1.3. Outros carnívoros**

Num estudo experimental, desenvolvido por McAllister et al., (1998b), não se conseguiu demonstrar que os gatos poderiam ser H.D. de *N. caninum*. Interessantemente, num estudo epidemiológico desenvolvido por Ould-Amrouche et al., (1999), foi verificado que a presença de gatos na exploração desempenha um fator de proteção à infecção por este parasita. É possível que a presença de gatos seja considerada um fator de proteção devido à ausência de cães, no entanto outra explicação possível para esta conclusão assenta no facto dos gatos serem predadores de supostos H.I., como os ratos, reduzindo assim a hipótese de ocorrer a ingestão de tecidos infetados destes pelos H.D. (Dubey et al., 2007).

### **2.8.1.4. Outros Hospedeiros Intermediários**

Além dos bovinos, existem outros hospedeiros intermediários de *N. caninum* que representam uma fonte de infecção para cães e outros canídeos. A presença de ADN de *N. caninum* em murganhos e ratos sugere que estes animais poderão ser uma importante fonte de infecção para carnívoros hospedeiros definitivos deste parasita (Huang et al., 2004; Hughes et al., 2006; Jenkins et al., 2007). Num estudo feito em França por Ould-Amrouche et al., (1999), os autores reportaram que a presença de coelhos e/ou patos pode constituir um fator de risco para a seropositividade em bovinos de leite. Num estudo feito no norte de Itália, o risco de seropositividade, a nível individual, aumenta com o número de cães presentes na exploração, quando na presença de aves na exploração (Otranto et al., 2003). Bartels et al., (1999), também verificaram que a presença de aves nas explorações constituía um fator de risco para a ocorrência de abortos associados a *N. caninum*, além disso também colocam a hipótese de que estes animais podem desempenhar um papel de vetor de oocistos provenientes de canídeos.

### **2.8.1.5. Pastoreio, forragens e água de abeberamento**

As pastagens, forragens e água contaminadas com oocistos são consideradas fontes potenciais de infecção pós-natal de bovinos. Portanto, é importante saber quais práticas de alimentação que representam um risco acrescido de infecção (Dubey et al., 2007). No noroeste dos Estados Unidos e na Itália, o pastoreio durante o verão parece ser um fator de proteção (Sanderson et al., 2000; Otranto et al., 2003). Apesar dos canídeos silvestres e cães terem acesso às pastagens, a contaminação destas por oocistos eliminados nas fezes dos H.D. pode



ser tão baixa que o risco de infecção é negligenciável ou os oocistos podem não sobreviver durante os meses de verão, no caso de serem quentes e secos.

Em bovinos de carne, o uso de manjedouras fixas aparenta ser um fator de risco para a seropositividade (Barling et al., 2001). A razão pela qual se considera que o uso de manjedouras fixas representa um fator de risco, reside no facto de que frequentemente as áreas para os animais são menores e as vacas parirem, abortarem ou expelirem membranas fetais junto destas manjedouras. Uma vez que estas manjedouras raramente são movidas, coloca-se a hipótese da ocorrência de uma grande contaminação fecal da área envolvente por parte dos H.D. nas mesmas áreas onde uns dias antes ocorreu a ingestão de membranas fetais (Barling et al., 2001). No mesmo estudo, uma conduta implementada para evitar a contaminação da forragem, como o uso de dispensadores fixos de concentrado, foi identificado como um provável fator de proteção (Barling et al., 2001). No entanto, o acesso de canídeos silvestres ao concentrado de desmame representa um risco acrescido para a infecção dos vitelos por *N. caninum* (Barling et al., 2001).

Num estudo conduzido em França, o uso de água proveniente de lagoas em detrimento de água oriunda de poços ou da rede pública para o abeberamento animal, foi considerado um fator de risco para a infecção por *N. caninum* em bovinos de leite (Ould-Amrouche et al., 1999). Dados epidemiológicos de mamíferos marinhos selvagens sugerem que os oocistos de *N. caninum* podem contaminar águas superficiais e posteriormente água do mar e infetar estes últimos (Dubey, 2004b; Dubey et al., 2003).

#### **2.8.1.6. Ingestão de colostro ou leite**

A infecção de vitelos neonatos através da ingestão de leite foi demonstrada em estudos experimentais após o fornecimento de leite contendo taquizoítos (Davison et al., 2001; Uggla et al., 1998). Todavia, Davison et al., (2001) verificaram que vitelos nascidos de mães seronegativas, não ficaram infetados após a ingestão de leite de vacas seropositivas. Apesar de se ter encontrado ADN de *N. caninum* em leite de bovinos (Moskwa et al., 2007, 2003), encontra-se em curso um debate sobre a possibilidade da ocorrência de transmissão deste agente por via lactogénica. Num estudo realizado em bovinos leiteiros por Corbellini et al., (2006), estes sugeriram que o fornecimento de colostro agrupado de diferentes animais constitui um fator de risco para a seropositividade.

#### **2.8.1.7. Maneio da Época de Parto**

Num estudo realizado em vitelos de carne no Texas, verificou-se que, ter uma época de parto sazonal em que os animais parem durante a primavera, teve um efeito profundo no aumento do risco de infecção por *N. caninum*, quando comparado a explorações cujos partos ocorriam no outono (Barling et al., 2001). Os autores não referiram qualquer explicação para estes resultados mas, possivelmente, existem efeitos sazonais nas vacadas de carne sobre o risco de infecção dos vitelos, seja por transmissão transplacentária ou horizontal (pós-natal) (Dubey et al., 2007). Esta sazonalidade poderá estar biologicamente ligada à época de partos

dos H.D. silvestres (como os coiotes) encontrados no Texas (Dubey et al., 2007). Uma vez que cães jovens ou que nunca contactaram com *N. caninum* são mais suscetíveis à infeção por este agente comparativamente a cães mais velhos ou imunes (Dijkstra et al., 2001b; Gondim et al., 2005; Schares et al., 2001a), assim sendo é possível extrapolar o mesmo para coiotes jovens (Dubey et al., 2007). Noutro estudo francês, reparou-se que épocas de parto prolongadas, de três a seis meses ou de seis a doze meses, reduzem o risco de infeção dos animais comparativamente a explorações com épocas de parto mais curtas até três meses (Ould-Amrouche et al., 1999). No entanto, os autores não apresentaram nenhuma explicação para estes resultados.

#### **2.8.1.8. Densidade animal e área da exploração**

Em dois estudos feitos em vitelos de carne no Texas, uma alta densidade animal foi identificada como um potencial fator de risco para a infeção por *N. caninum* (Barling et al., 2001, 2000b). Sanderson et al., (2000) observaram também um efeito semelhante sobre a densidade animal em bovinos de carne durante o inverno no noroeste dos Estados Unidos. Este efeito foi explicado pelo facto de explorações com elevada densidade animal serem mais propensas a realizar a suplementação alimentar dos animais (Barling et al., 2001, 2000b). Uma vez que os locais onde se armazenam as forragens e os suplementos alimentares podem atrair facilmente roedores, que poderão ser eventuais presas para os H.D. de *N. caninum*, deve-se considerar que estes têm uma maior probabilidade de estarem contaminados com as fezes dos H.D., aumentando assim o risco de infeção pós-natal (Barling et al., 2000b).

Num estudo feito no Brasil por Corbellini et al., (2006), observou-se que, com o aumento da área da exploração, a prevalência da infeção por este agente nas explorações leiteiras em estudo diminuía. No entanto, não foi possível relacionar este efeito protetor com a densidade animal. Os autores levantaram a hipótese de que, em explorações de menor dimensão, seja mais fácil o acesso dos cães da exploração a carcaças de bovinos, fetos abortados, membranas fetais e descargas uterinas que em explorações de maior tamanho.

#### **2.8.1.9. Tamanho da manada**

Num estudo realizado em Itália, o risco de um animal ficar infetado aumenta à medida que o tamanho da manada também aumenta. Nesse mesmo estudo, os autores verificaram que o risco de infeção em manadas numerosas aumenta com o aumento do número de cães na exploração (Otranto et al., 2003). Noutro estudo conduzido na Alemanha por Schares et al., (2004b), foi observado que explorações com manadas de maior dimensão apresentavam um risco acrescido de serem positivas em provas ELISA no leite de tanque. Uma das explicações para o que foi observado poderá basear-se no facto de que, com o aumento do tamanho da manada, por exemplo pela aquisição de novilhas de substituição de outra exploração, ocorre um aumento da probabilidade de infeção por *N. caninum*. Outra explicação para o sucedido poderá estar relacionada com o facto das medidas de higiene, responsáveis pela prevenção da ingestão

de membranas fetais ou outros materiais infetados por parte dos cães, serem mais difíceis de respeitar em manadas de maior dimensão do que em manadas de menor dimensão (Schaes et al., 2004b).

#### **2.8.1.10. Proveniência das novilhas de substituição**

A transmissão vertical de *N. caninum* é altamente eficiente. Como tal, a criação de novilhas de substituição na própria exploração, em vez de adquiri-las noutras explorações negativas, suporta as alegações de que a prevalência da infeção por este agente numa exploração poderá persistir por muitos anos (Stenlund et al., 2003; Frössling et al., 2005). Se a seroprevalência na exploração que adquire as novilhas de substituição for superior à da exploração que as fornece, a compra destes animais irá reduzir a prevalência de infeção da primeira. Isto explica o porquê de se ter identificado a criação das próprias novilhas de substituição como um fator de risco para o aumento da prevalência da infeção por este agente em vitelos (Barling et al., 2001).

#### **2.8.1.11. Clima**

Em dois estudos europeus foram analisados os efeitos das condições climáticas sobre o risco de infeção por *N. caninum* a nível individual ou de rebanho, tendo sido identificados como fatores de risco as temperaturas médias na primavera numa zona à volta da exploração e as temperaturas médias em julho no município onde se encontra a exploração (Schaes et al., 2004b; Rinaldi et al., 2005). Estas observações podem ser explicadas pelos efeitos do clima na esporulação ou sobrevivência dos oocistos. Por exemplo, temperaturas mais elevadas (ainda sem limites definidos) podem favorecer uma esporulação mais rápida dos oocistos presentes nas silagens ou no ambiente envolvente (Dubey et al., 2007).

#### **2.8.1.12. Densidade populacional humana**

Num estudo realizado na Alemanha por Schaes et al., (2003), verificou-se a existência de uma correlação positiva entre a densidade da população humana e a densidade da população canina e que, à semelhança da densidade populacional canina, este primeiro indicador pode ser usado como fator preditivo, em distritos e cidades, da prevalência de explorações positivas em amostras de leite de tanque.

#### **2.8.1.13. Raça**

Existem relatos de vários países onde a prevalência da infeção por *N. caninum* difere consoante as diferentes raças de bovinos (Bartels et al., 2006a). No entanto, estes resultados devem ser interpretados com cautela uma vez que as diferenças observadas poderão estar relacionadas com os diferentes sistemas de produção usados para as diferentes raças e não apenas pelas diferentes suscetibilidades à infeção associadas às diferentes raças (Dubey et al., 2007). Por exemplo, as raças nativas espanholas apresentavam uma menor probabilidade de serem seropositivas em comparação com as raças Holstein-Frísia, Rubia Galega, e outros

cruzamentos. Isto é explicado pela diferença do grau de intensificação do manejo uma vez que, em Espanha, as raças Holstein-Frísia e Rubia Galega são exploradas de forma mais intensiva, ao contrário das raças nativas deste país que pastoreiam em zonas tipicamente montanhosas com uma muito baixa densidade animal (Bartels et al., 2006b). Neste mesmo estudo também verificaram, na Suécia, que os animais da raça Vermelha Sueca tinham maior probabilidade de serem seropositivos em relação às restantes raças usadas neste país (Bartels et al., 2006b).

#### **2.8.1.14. Tipo de Alojamento**

Ould-Amrouche et al., (1999) comparou a influência do tipo de alojamento, em explorações leiteiras francesas, no risco de infeção por *N. caninum*. Os autores deste estudo observaram que os animais em estabulação presa apresentavam um risco de serem seropositivos superior ao dos animais em estabulação livre. No entanto, os autores não encontraram qualquer explicação para este achado.

### **2.8.2. Risco de Aborto**

Os fatores responsáveis pela ocorrência de abortos de carácter epidémico podem ser completamente diferentes daqueles que influenciam o risco de abortos de carácter endémico (Dubey et al., 2007). Segundo Dubey et al., (2007), a análise dos fatores de risco muitas vezes apresenta o inconveniente de não existirem informações acerca do carácter (endémico ou epidémico) dos abortos observados. Consequentemente, não é possível relacionar os fatores de risco ou os fatores de proteção, identificados em estudos epidemiológicos, com a ocorrência de abortos de carácter endémico ou epidémico.

A maior parte das análises feitas aos fatores de risco são baseadas em estudos de caso-controlo limitados a explorações com surtos de abortos (Bartels et al., 1999; Wouda et al., 1999a) e, por conseguinte, os fatores de risco identificados nestes estudos apenas podem ser relacionados com a ocorrência de abortos de carácter epidémico (Dubey et al., 2007).

Além de existirem fatores que apenas influenciam o risco de aborto associado a *N. caninum*, existem também um variado conjunto de fatores tipicamente identificados como fatores de risco ou de proteção para a infeção por este agente, que também influenciam o risco de aborto (Dubey et al., 2007).

#### **2.8.2.1. Seropositividade individual**

Inúmeros estudos demonstraram que animais seropositivos apresentam uma maior probabilidade de abortar que animais seronegativos (Thurmond et al., 1997; Moen et al., 1998; Jensen et al., 1999; Schares et al., 1999, 2002; López-Gatius et al., 2004b; Garcia-Vazquez et al., 2005; Weston et al., 2005).

O risco da ocorrência de aborto aumenta com a subida dos níveis de anticorpos anti-*N. caninum* específicos (M. M. McAllister et al., 1996; Schares et al., 1999; Wouda et al., 1999a; Schares et al., 2000; Stenlund et al., 2003; Kashiwazaki et al., 2004; López-Gatius et al., 2005c). De Meerschman et al., (2002) verificaram uma forte associação entre o nível de anticorpos

maternos e a ocorrência de lesões histopatológicas em fetos abortados e infetados por *N. caninum*. No que diz respeito à infecção pós-natal, a presença de um elevado nível de anticorpos num animal pode ser indicativo de uma elevada dose infetante e/ou de uma multiplicação bastante eficiente deste parasita. No caso das infecções latentes, um alto nível ou título de anticorpos pode refletir a intensidade do fenómeno de recrudescimento de uma infecção pré-existente (Dubey et al., 2007). Existem evidências, provenientes de estudos prospetivos realizados em vacas com infecções latentes, que a intensidade e a duração do aumento dos anticorpos específicos durante a gestação podem estar relacionados com o risco de infecção fetal (Stenlund et al., 1999; Guy et al., 2001). Por isso, pode ser possível utilizar informações sobre os níveis individuais de anticorpos anti-*N. caninum* específicos ou os títulos de anticorpos (e não apenas a seropositividade) como uma ferramenta preditiva para identificar animais com alto risco de aborto em explorações com elevada prevalência de infecção por *N. caninum* (Quintanilla-Gozalo et al., 2000).

### **2.8.2.2. Prevalência na manada**

Diversos autores observaram que uma grande prevalência de infecção por *N. caninum* na manada está associada a um risco acrescido de aborto ao nível da manada (Paré et al., 1998; Bartels et al., 1999; Wouda et al., 1999a; Sager et al., 2001; Schares et al., 2004b; Hobson et al., 2005). Esta afirmação é explicada pelo facto de que animais infetados recentemente ou com infecções latentes têm uma maior probabilidade de abortar, como referido anteriormente. No entanto, nem todas as explorações com elevada prevalência de *N. caninum* sofrem de abortos associados à infecção por este agente (Paré et al., 1998; Jensen et al., 1999; Schares et al., 2004b). Estudos feitos por longos períodos de tempo, em explorações com história de ocorrência de surtos de abortos, revelaram a manutenção ou um ligeiro aumento das taxas de aborto nos anos após o surto (Pfeiffer et al., 2002; Björkman et al., 2003). Exposição recente à infecção por *N. caninum*, como comprovado pela seroconversão e baixa avidéz dos anticorpos anti-*N. caninum*, não leva necessariamente a um aumento da taxa de abortos (Dijkstra et al., 2002). Isto corrobora a hipótese de que, além da infecção, o risco de aborto pode ser influenciado por outros fatores (Dubey et al., 2007).

### **2.8.2.3. Idade**

Num estudo caso-controlo, desenvolvido por Wouda et al., (1999a), em explorações com história de ocorrência de abortos epidémicos associados a *N. caninum*, os autores relataram que o risco de aborto aumenta com o aumento da paridade dos animais. No entanto, em explorações com abortos de carácter endémico associados a *N. caninum*, o aumento da idade parece ter um efeito reverso. Por exemplo, num estudo do risco de aborto em vacas leiteiras seropositivas, os autores identificaram o aumento do número de lactações como um fator de proteção (López-Gatius et al., 2005a). Estes achados confirmam os relatos prévios de um estudo realizado por Thurmond e Hietala, (1997a), em que estes autores verificaram que novilhas congenitamente

infetadas tinham um risco de aborto 7,4 vezes maior que as restantes novilhas seronegativas, na sua segunda gestação estes animais apenas tinham um risco de aborto 1,7 vezes superior às restantes seronegativas e, na sua terceira gestação, o risco da ocorrência de aborto era semelhante aos animais seronegativos. Noutro estudo conduzido numa exploração de bovinos leiteiros com história de abortos de carácter endémico associados a *N. caninum* em que a transmissão transplacentária endógena era o principal forma de transmissão, Hernandez et al., (2002) observaram um risco de aborto na ordem das 2,8 vezes na segunda gestação de animais seropositivos, mas não nas gestações da primeira, terceira e posteriores lactações.

### **2.8.2.3. Cães de exploração**

A presença de cães de exploração, o seu número e a frequência de observação destes a defecar na manjedoura foram associados com um aumento do risco de aborto a nível da manada (Bartels et al., 1999; Hobson et al., 2005). Ainda assim, noutros estudos realizados, não se observou qualquer associação entre a presença de cães de exploração e abortos (Mainar-Jaime et al., 1999; Romero et al., 2002; Fischer et al., 2003). Todavia, uma vez que existem muitas outras causas de aborto e, os abortos associados a *N. caninum* nem sempre estão relacionados com a transmissão horizontal podendo ocorrer também em fêmeas cronicamente infetadas, não é expectável que exista sempre uma associação positiva entre a presença ou o número de cães de exploração com o aborto bovino (Dubey et al., 2007). Um dos estudos que identifica esta associação entre a presença de cães de exploração e abortos associados a *N. caninum* analisaram, seletivamente, os fatores de risco envolvidos nos abortos de carácter epidémico. Como os abortos epidémicos são muito provavelmente causados pela transmissão horizontal via oocistos esporulados, é expectável o reconhecimento da presença de H.D. na exploração como um fator de risco (Bartels et al., 1999).

Wouda et al., (1999b) encontraram uma correlação positiva entre a seropositividade dos cães de exploração com o aumento da prevalência da infeção em bovinos, evidenciando a existência de uma relação entre a infeção quer dos cães quer dos bovinos. Neste estudo, os cães em analisados estavam presentes em explorações com abortos de carácter epidémico e endémico (Wouda et al., 1999b).

### **2.8.2.4. Canídeos silvestres**

Num estudo feito por Hobson et al., (2005), a frequência com que os canídeos silvestres foram observados nas imediações da exploração em estudo mostrou ter um efeito protetor sobre a probabilidade da ocorrência de aborto associado a *N. caninum*. Este efeito protetor foi explicado pelos autores que colocaram a hipótese da existência de uma interação negativa entre a presença de cães de exploração e canídeos silvestres, estes assumiram que quanto maior o número de cães de exploração, menor seria a chance de se observarem canídeos silvestres nas imediações da exploração.

### **2.8.2.5. Gatos**

Em concordância com um estudo de avaliação do risco de infecção (Ould-Amrouche et al., 1999), a frequência com que são observados gatos vadios nas proximidades das explorações foi reconhecida como um fator de proteção para a ocorrência de aborto associado a este parasita (Hobson et al., 2005). Hobson et al., (2005) assumiram que a presença destes felinos pode ser um indicador da ausência de cães, resultando num reduzido risco de transmissão horizontal.

### **2.8.2.6. Outros hospedeiros intermediários (como aves e cavalos)**

Explorações em que se registou a ocorrência de surtos de abortos associados a *N. caninum* na Holanda mantinham mais frequentemente, além dos bovinos, um grande número de aves de capoeira (mais de dez). Até o momento, não existe explicação biológica para o aumento do risco que a presença destes animais pode representar, uma vez que as aves ainda não foram identificadas como hospedeiras de *N. caninum* (Gondim, 2006). No entanto, como o risco de infecção parece aumentar com o número de cães de exploração quando as aves estão presentes (Otranto et al., 2003), são necessários mais estudos sobre a suscetibilidade e o papel das aves na biologia de *N. caninum* (Dubey et al., 2007).

Num estudo canadiano foi observada uma associação entre o número de cavalos numa exploração e a ocorrência de aborto relacionado com *N. caninum* (Hobson et al., 2005). A razão por detrás desta associação ainda não está completamente elucidada. Os cavalos são conhecidos, para além de H.I. de *N. caninum*, também de *N. hughesi* (Marsh et al., 1998). Até agora, *N. hughesi* não foi isolado em bovinos. Assim sendo, a influência deste agente no aborto bovino ainda é desconhecida (Dubey et al., 2007).

### **2.8.2.7. Forragens**

O fornecimento de forragens de qualidade inferior, como alimentação de bovinos de leite com silagem de milho com bolor durante o Verão ou fornecer sobras de silagem às novilhas durante o Verão, foi considerado um fator de risco para a ocorrência de abortos de carácter epidémico associados a *N. caninum*, num estudo feito na Holanda (Bartels et al., 1999). Os efeitos do fornecimento destas silagens de qualidade inferior poderá ser uma consequência do impacto de toxinas de origem fúngica no sistema imune dos animais (Bartels et al., 1999; Thurmond et al., 1995; Wouda et al., 1999a). Além disso, o fornecimento de sobras pode conter uma grande proporção de contaminantes, como contaminações fecais dos H.D., outra explicação assenta no facto de que o uso de alimentos inadequados na ração diária poderá provocar stress nos animais (Dubey et al., 2007).

### **2.8.2.8. Clima e estação do ano**

Thurmond et al., (1995) observaram um padrão sazonal de entrega de fetos abortados positivos para *N. caninum* altamente significativo, na Califórnia. O maior número de entregas foi registado no Inverno, que na Califórnia é ameno e húmido contrastando com o Verão, que é quente e seco. Wouda et al., (1999a) observaram na Holanda que os eventos de abortos

epidêmicos ocorrem, mais frequentemente, durante o Verão, que é quente e húmido. Existem várias explicações possíveis para este fenómeno. As temperaturas amenas em associação com a humidade favorecem a esporulação e sobrevivência dos oocistos deste protozoário, podendo assim incrementar o risco de infeção pós-natal. Outra explicação assenta no facto de que temperaturas amenas e humidades elevadas beneficiam o crescimento fúngico nas silagens. As toxinas produzidas por estes micro-organismos podem provocar uma depressão do sistema imune dos animais, permitindo assim a ocorrência do fenómeno de recrudescimento da infeção por *N. caninum* em animais com infeções latentes (Bartels et al., 1999; Thurmond et al., 1995; Wouda et al., 1999a).

Um estudo da análise do risco de aborto em fêmeas seropositivas para este agente realizado em duas vacarias espanholas, foi verificada uma associação significativa entre a ocorrência de chuva e aborto. Os autores deste estudo suspeitaram que o aumento da pluviosidade pode causar stress direto e indireto aos animais através do aumento da produção calórica em resposta às temperaturas baixas, stress comportamental, deterioração da qualidade dos alimentos e diminuição das condições de higiene. Foi então colocada a hipótese de que todas estas variantes poderiam concorrer para a ocorrência de aborto em animais cronicamente infetados (López-Gatius et al., 2005a).

#### **2.8.2.9. Criação de novilhas de substituição na própria exploração**

Num estudo conduzido por Hässig e Gottstein, (2002) na Suíça, a manutenção de fêmeas que já tinham abortado e a criação das próprias novilhas de substituição na mesma exploração foram identificados como possíveis fatores de risco para a ocorrência de aborto associado a *N. caninum*. Estes achados encontram-se em concordância com o que se verificou num estudo previamente realizado em manadas de carne (Barling et al., 2001).

#### **2.8.2.10. Proximidade com cidades ou vilas**

No mesmo estudo desenvolvido por Hässig e Gottstein, (2002), a proximidade com cidades ou vilas foi identificada como um fator de risco para a ocorrência de abortos associados a *N. caninum*. Esta observação encontra-se de acordo com o verificado num estudo alemão que demonstrou que as explorações tinham um risco aumentado de serem positivas a *N. caninum* numa prova ELISA com leite de tanque se estas estivessem localizadas em distritos ou cidades com uma elevada densidade populacional humana (Schaes et al., 2003).

#### **2.8.2.11. Tipo de alojamento**

Em dois estudos foi observado que o tipo de alojamento dos animais influenciava o risco de ocorrência de aborto associado a *N. caninum*. Hässig e Gottstein, (2002) identificaram a estabulação livre como um fator de risco para o acontecimento de aborto. Aparentemente, a estabulação livre está relacionada com práticas de manejo desconhecidas responsáveis pelo aumento do risco de aborto (Dubey et al., 2007). Por exemplo, Schaes et al., (2004b) identificaram uma associação entre a estabulação e o tamanho das manadas uma vez que, em



manadas grandes, os animais eram mais propensos a serem mantidos em currais. Por outro lado, Ould-Amrouche et al., (1999) identificaram a estabulação livre como um fator de proteção para a infeção por este agente.

Num estudo canadiano, o alojamento de novilhas estabuladas em grupos, isoladas dos animais mais velhos, reduziu o risco de aborto (Hobson et al., 2005).

#### **2.8.2.12. Fatores ligados à reprodução**

Num estudo sobre o risco de aborto em vacas congenitamente infetadas, foi observado que as fêmeas infetadas, que já tinham abortado anteriormente, tinham um risco de ocorrência de um novo aborto 5,6 vezes superior ao das vacas com infeções congénitas mas que não tinham abortado (Thurmond e Hietala, 1997a).

Um estudo canadense, revelou a existência de uma associação entre a ocorrência de abortos ligados a *N. caninum* numa manada com a taxa de retorno ao cio após gestação confirmada (Hobson et al., 2005). Uma alta taxa de perdas precoces da gestação pode aumentar a probabilidade dos H.D. terem acesso a materiais infecciosos, aumentando assim a taxa de transmissão horizontal mediada pela ingestão de oocistos (Dubey et al., 2007). Por outro lado, este resultado pode indicar que *N. caninum* está associado não só ao aborto como também com perdas gestacionais precoces, existindo mais quatro estudos que suportam este facto (Waldner et al., 1998, 2001; Muñoz-Zanzi et al., 2004; Waldner, 2005). Neste contexto, deve ser referido que fêmeas infetadas experimentalmente no dia 70 pós-inseminação, com altas doses de taquizoítos de *N. caninum*, apresentaram uma maior suscetibilidade para a ocorrência de aborto que outras fêmeas infetadas com a mesma dose mas nos dias 140 e 210 após a inseminação (Williams et al., 2000). No entanto, um grande número de outros estudos não observaram qualquer indício de que este parasita fosse capaz de provocar perdas de gestação precoces (Björkman et al., 1996; Jensen et al., 1999; López-Gatius et al., 2004b, 2005b; Romero et al., 2005).

Dois estudos indicam que o risco de aborto relacionado com a infeção por *N. caninum* pode ser aumentado com uma taxa anual de retenção de membranas fetais crescente (Bartels et al., 1999; Hobson et al., 2005). Este facto pode estar associado com infeções por *N. caninum* de dois modos distintos: uma maior taxa de retenção de membranas fetais pode providenciar mais fontes de infeção para os H.D. e assim aumentar a probabilidade de transmissão horizontal por ingestão de oocistos ou, por outro lado, este protozoário pode não estar apenas associado à ocorrência de aborto como também pode estar envolvido na patogénese da retenção de membranas fetais (Dubey et al., 2007).

Num estudo prospetivo em que se utilizou sémen de touros de leite e de carne para inseminar vacas leiteiras seropositivas, foi observado que o uso de sémen de touros de carne reduziu o risco de aborto (López-Gatius et al., 2005c), este achado foi posteriormente confirmado por outros dois estudos (López-Gatius et al., 2005a; Almería et al., 2009). Foi colocada a hipótese de que a função placentária poderá ser favorecida em gestações originadas pelo cruzamento de

raças, possivelmente através do aumento da concentração das glicoproteínas associadas à gestação (PAG). Num outro estudo conduzido por López-Gatius et al., (2007b), os autores mostraram que a infeção por *N. caninum* não afeta a concentração das PAG-1, em animais cronicamente infetados que nunca tenham abortado.

Bartels et al., (1999) observaram que, explorações nas quais as maternidades eram utilizadas para alojar animais doentes, tinham um maior risco de ocorrer episódios de abortos de carácter epidémico.

### **2.8.2.13. Participação em feiras e concursos**

Bartels et al., (1999) repararam que explorações que participaram em feiras e concursos, nos dois anos anteriores ao estudo, tiveram um risco reduzido de ocorrência de abortos epidémicos associados a *N. caninum*. Possivelmente a participação nestes eventos poderá estar negativamente associada a fatores como a “criação das próprias novilhas de substituição” (Barling et al., 2001) e “manutenção de fêmeas que já tinham abortado e a criação das próprias novilhas de substituição na mesma exploração” (Hässig e Gottstein, 2002) uma vez que esta prática pode indicar que uma grande proporção de novilhas de substituição sejam provenientes de fontes externas (Dubey et al., 2007).

## **2.9. Tratamento**

Até à presente data, não existe nenhum tratamento para a neosporose, cuja utilização tenha sido demonstrada como segura e eficaz (Dubey et al., 2007).

De um ponto de vista económico e prático, o tratamento em bovinos é inviável uma vez que apenas pode ser usado como medida preventiva e por longos períodos de tempo, produzindo pouco ou nenhum efeito na contenção de um surto epidémico de abortos, além disso a terapêutica acaba por levar a longos períodos de intervalo de segurança, bem como resíduos na carne e descarte de leite, tornando o tratamento nesta espécie ainda mais restritivo (Reichel e Ellis, 2002).

Apesar de tudo, diversos estudos experimentais demonstraram vários compostos, como toltrazuril (Darius et al., 2004; Haerdi et al., 2006; Strohbusch et al., 2009; Syed-Hussain et al., 2015), ponazuril (Kritzner et al., 2002), associação entre sulfadiazina e trimetoprim (Cuteri et al., 2005), nitro e bromotiazolidina (Esposito et al., 2007), nitazoxanida (Debache et al., 2011), buparvaquona (Müller et al., 2015), ruténio (Barna et al., 2013), artemisina (Mazuz et al., 2012) e inibidores da tirosina-quinase (Ojo et al., 2014; Winzer et al., 2015), com efeitos interessantes quer *in vitro* quer *in vivo* (Hemphill et al., 2016). Muitos destes compostos mostraram ser eficazes contra outros parasitas protozoários intracelulares, como *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* spp., além disso também exibiram uma atividade antiparasitária de largo-espectro contra vários protozoários e helmintes (Hemphill et al., 2016). No entanto, apesar de se terem obtido resultados promissores, o tratamento farmacológico da neosporose acarreta um problema relacionado com o momento da sua administração, uma vez que, na grande maioria dos casos, não existem

quaisquer sinais de infecção, a não ser no momento em que ocorre o aborto, e nessa altura será tarde demais para instituir qualquer tratamento (Benavides et al., 2014).

Após a administração oral de fármacos espera-se que estes sejam eficazes contra os esporozoítos de *N. caninum*. Além disso, estes medicamentos devem ser efetivos contra taquizoítos e bradizoítos, representantes da fase aguda e crônica da doença, respetivamente (Debache et al., 2011). Idealmente, segundo Roberto Sánchez-Sánchez et al., (2018), o tratamento contra esporozoítos e bradizoítos passa pela utilização de compostos com capacidade parasiticida, já contra taquizoítos podem também ser utilizadas drogas com capacidade parasitostática uma vez que estas formas parasitárias têm uma menor capacidade de resistir à resposta imune do hospedeiro. Adicionalmente, devem ser usados fármacos com uma baixa toxicidade e capazes de atravessar a barreira hematoencefálica para permitir uma eliminação efetiva de quistos tecidulares cerebrais (Neville et al., 2015).

Em termos práticos, um tratamento eficaz contra a neosporose deve ser capaz de conferir proteção contra a infecção bem como a cura desta, sendo também de administração segura durante a gestação (Aguado-Martínez et al., 2017). Além disso, deve assentar em três níveis (Fig. 14): tratamento ou profilaxia terapêutica dos H.I.; tratamento de vitelos, borregos e cabritos infetados congenitamente; e tratamento dos H.D. com o intuito de reduzir a contaminação ambiental por oocistos (Sánchez-Sánchez et al., 2018).

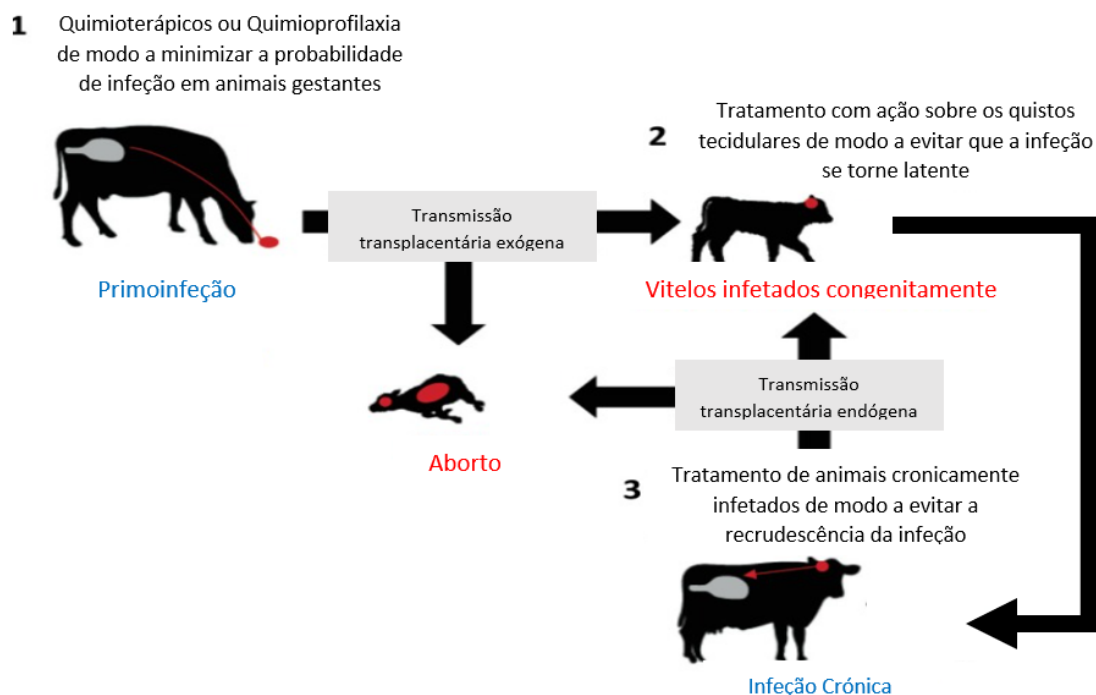


Figura 14. Diferentes níveis de abordagem quimioterápica e quimioprofilática contra a neosporose em bovinos. Adaptado de Sánchez-Sánchez et al., (2018)

Uma abordagem imunoquimioterapêutica abrangente com uma combinação da imunidade protetora gerada por vacinas (aplicadas antes da inseminação/monta natural) e a capacidade de compostos bioativos (aplicados no período de gestação onde a ocorrência de

abortos é mais provável), para limitar a proliferação e disseminação de taquizoítos ou para eliminar quistos tecidulares, seria uma ótima opção para o controle da neosporose em ruminantes (Hemphill et al., 2016).

Uma vez que não existem opções terapêuticas disponíveis, que sejam suficientemente eficazes para debelar a infecção por *N. caninum*, a utilização de diferentes métodos de controle adquiriu uma enorme importância de modo a evitar grandes perdas económicas e a promover o bem-estar animal (Aguado-Martínez et al., 2017).

## 2.10. Prevenção e controlo

Em efetivos livres da infecção por *N. caninum*, a prevenção da introdução deste protozoário, através de medidas de biossegurança gerais, deve ser o objetivo primordial de qualquer exploração (Haddad et al., 2005). Ao passo que, em explorações em que se verificou a presença deste agente, devem ser instituídos programas de controlo, visando o objetivo de reduzir a ocorrência de transmissão da infecção por via vertical, através da redução do número de animais seropositivos e/ou através da mitigação do risco de ocorrência de transmissão horizontal de *N. caninum*, principalmente através do controlo da população de H.D., com acesso aos parques e alimento dos animais, evitando a contaminação por oocistos (Reichel e Ellis, 2002; Larson et al., 2004; Haddad et al., 2005; Hall et al., 2005). Foram sugeridas, por diversos autores, diferentes medidas de controlo, desde a não tomada de qualquer medida até à melhoria das medidas de biossegurança das explorações, introdução de novas alternativas no maneio reprodutivo da manada, utilização de diferentes fármacos de forma profilática, vacinação, e a adoção de estratégias de “testagem e refugo” (Nishikawa et al., 2002; Reichel e Ellis, 2002; Larson et al., 2004; Haddad et al., 2005; Hall et al., 2005).

No entanto, devido a uma transmissão vertical eficiente associada a uma alta prevalência de infecção, em certas explorações de bovinos, a prevenção e controlo da neosporose é um desafio difícil (Mazuz et al., 2021).

### 2.10.1. Medidas de Biossegurança

No contexto deste trabalho, a biossegurança é considerada como o resultado de todas as ações realizadas para impedir a introdução de agentes patogénicos numa população animal. Como tal, são descritas diferentes medidas, recomendadas por diversos autores, com o objetivo de evitar a entrada de animais infetados com *N. caninum* quer em explorações livres deste agente quer em explorações em que este já se encontra presente, e evitar ou diminuir a probabilidade da ocorrência de transmissão vertical e horizontal da infecção em efetivos com animais infetados (Dubey et al., 2007).

#### 2.10.1.1. Quarentena e testagem de animais comprados e de substituição

Devido à grande importância da ocorrência de transmissão vertical na manutenção da infecção numa manada e do papel das membranas fetais na disseminação da infecção pelos H.D., uma das formas de atenuar este problema passa pela aquisição de animais de substituição

provenientes de efetivos livres da infeção por este protozoário ou de explorações com excelentes desempenhos reprodutivos, e pela testagem de todos os potenciais animais de substituição, sendo esta última medida de extrema importância para efetivos livres de *N. caninum* (Dubey et al., 2007).

#### **2.10.1.2. Prevenção da transmissão por cães e outros H.D.**

De maneira a prevenir a ocorrência de transmissão horizontal, deve-se impedir a contaminação das pastagens e outros alimentos (silagens e fenos) por oocistos eliminados nas fezes dos cães e outros H.D., além disso o controlo da presença de canídeos H.D., nas explorações pecuárias, permite a redução da transmissão da infeção para os H.I..

Em explorações leiteiras de manejo intensivo, a presença de cães deve ser evitada ou, pelo menos, devem ser colocadas vedações que impeçam o acesso destes aos bovinos e às zonas de armazenamento dos alimentos. Recomenda-se também a adoção de medidas de higiene relativas à presença de fezes nas pastagens e eliminação destas. Em explorações de manejo extensivo, além dos cães domésticos, e abandonados, deve-se ter em conta o papel dos H.D. silvestres no ciclo biológico do parasita. Nestas explorações a presença de cães pode permitir a redução do número de H.D. silvestres nas imediações (Gondim et al., 2004b; Rosypal e Lindsay, 2005). Uma vez que cães mais jovens eliminam maior número de oocistos nas fezes, após a infeção, que cães mais velhos (Gondim et al., 2005), a presença de cadelas gestantes ou de cadelas acompanhadas pelas suas ninhadas deve ser evitada nos locais descritos anteriormente (Dubey et al., 2007).

Deve-se restringir ao máximo o acesso de cães e outros potenciais carnívoros H.D. a tecidos infetados de H.I., o risco de infeção destes carnívoros pode ser diminuído caso se proceda a uma eliminação segura de fetos abortados, membranas fetais e outros tecidos potencialmente infetados provenientes de bovinos. Além disso em locais em que tipicamente é observada a presença simultânea de animais intervenientes no ciclo silvático de *N. caninum* como coiotes ou lobos (H.D.) e veados (H.I.), é importante proceder-se à eliminação de possíveis órgãos e tecidos infetados destes últimos e, porventura, de outros possíveis H.I. silvestres, de modo a evitar a ingestão destes tecidos por cães e outros carnívoros H.D. silvestres (Dubey et al., 2007).

#### **2.10.1.3. Prevenção da contaminação da água**

Uma vez que a fonte de água (lagoa, poço e rede pública) foi demonstrada como um provável fator de risco para a infeção por *N. caninum* em bovinos (Ould-Amrouche et al., 1999) e se ter demonstrado a transmissão do parasita *T. gondii* por via hídrica (Bowie et al., 1997; de Moura et al., 2006), devem ser instituídas medidas que evitem a contaminação da água de abeberamento dos animais com oocistos de *N. caninum* (Dubey et al., 2007).

#### **2.10.1.4. Controlo de roedores**

É recomendada a implementação de medidas de controlo regular de roedores, de modo a reduzir o risco de infeção de cães por este parasita ao predarem os primeiros (Bartels et al., 1999; Hughes et al., 2006; Dubey et al., 2007; Jenkins et al., 2007).

#### **2.10.1.5. Prevenção de potenciais fatores para o recrudescimento da infeção**

Devem ser evitados todos os fatores responsáveis por desencadear imunodepressão nos animais, como o fornecimento de silagens com bolores, uma vez que estas podem conter diversos tipos de micotoxinas. Outros fatores responsáveis pela depressão da imunidade durante a gestação, como o stress e desequilíbrios alimentares, são mais difíceis de controlar (Bartels et al., 1999).

#### **2.10.2. Medidas reprodutivas**

Têm sido propostas várias medidas de manejo reprodutivo com o objetivo de reduzir a probabilidade e o impacto económico da ocorrência de transmissão transplacentária endógena em manadas infetadas (Dubey et al., 2007).

##### **2.10.2.1. Transferência embrionária**

A transferência de embriões provenientes de mães infetadas para recetoras não infetadas pode prevenir a ocorrência de transmissão transplacentária endógena de *N. caninum*, no entanto, no sentido inverso, não se recomenda (Baillargeon et al., 2001). Num trabalho desenvolvido por Landmann et al., (2002), os autores confirmaram os achados do estudo referido anteriormente, mostrando que os procedimentos de transferência de embriões usados comercialmente também eram capazes de impedir a transferência da infeção por *N. caninum* de vacas seropositivas para recetoras seronegativas. Além disso, estes autores verificaram que embriões bovinos na fase de pré-implantação encontravam-se protegidos, contra a infeção por este protozoário, pela zona pelúcida.

Assim, esta técnica reprodutiva pode ser usada como forma de recuperar vitelos não infetados de mães geneticamente valiosas, mas infetadas com *N. caninum*. Como consequência, a realização de uma testagem pré-transferência das recetoras para a infeção por *N. caninum* é altamente recomendada. Apenas fêmeas não infetadas devem ser usadas como recetoras (Dubey et al., 2007). No entanto, devido aos elevados custos associados, o uso desta técnica encontra-se restrito a animais com elevado valor genético (Landmann et al., 2002).

##### **2.10.2.2. Inseminação artificial de animais positivos com sémen de touros de carne**

Ainda que a inseminação artificial não previna a ocorrência de transmissão transplacentária de *N. caninum* para o feto, o uso de sémen de bovinos de raças de aptidão cárnea, preferencialmente da raça Limousine (Almería et al., 2009), na inseminação de fêmeas

seropositivas permite reduzir o risco de ocorrência de aborto (Almería et al., 2009; López-Gatius et al., 2005c). Além da redução da prevalência da infecção na exploração, esta técnica também possibilita a diminuição das taxas de aborto, o aumento do número de lactações dos animais seropositivos (evitando o refugo precoce) e a diminuição dos prejuízos económicos com a venda dos animais cruzados (Almería et al., 2009).

### **2.10.3. Testagem e refugo**

Fêmeas infetadas com *N. caninum* devem ser consideradas como um reservatório deste parasita, permitindo que este se dissemine pelos restantes animais da exploração, lentamente por transmissão transplacentária endógena, ou rapidamente por transmissão horizontal, por exemplo, através da ingestão de alimentos ou água contaminados. Como consequência, os produtores podem decidir remover as vacas infetadas ou a sua descendência da manada. O refugo dos animais infetados é uma estratégia de controlo eficaz, mas nem sempre economicamente realista (Dubey et al., 2007).

As estratégias de “testagem e refugo” incluem diferentes opções: testar e refugar vacas seropositivas ou fêmeas seropositivas que tenham abortado; testar e inseminar as fêmeas descendentes de vacas seropositivas com sêmen de touros de carne, e testar e excluir os animais descendentes de vacas seropositivas da reprodução (Dubey et al., 2007). Todas estas opções já foram aplicadas com sucesso, também do ponto de visto económico, em algumas situações (Hall et al., 2005). Além disso, alguns estudos estimaram o retorno económico em explorações de bovinos de carne com infecção de carácter endémico após o uso das diferentes estratégias de “testagem e refugo”, como o refugo de fêmeas que não pariram, venda de fêmeas seropositivas e compra de fêmeas de substituição seronegativas, e exclusão das fêmeas descendentes de animais seropositivos como animais de substituição (Larson et al., 2004). De todas estas estratégias referidas, segundo Larson et al., (2004), a exclusão das fêmeas descendentes de animais seropositivos como potenciais animais de substituição proporcionou o melhor retorno económico. No entanto, deve-se ter em conta que estas abordagens apenas podem ser recomendadas para explorações em que a principal forma de transmissão da infecção seja feita por via transplacentária endógena (via vertical), além disso o refugo de fêmeas seropositivas e/ou exclusão destas da reprodução deve ser acompanhado pela sua substituição por animais livres de infecção (Dubey et al., 2007). Antes da aplicação de qualquer uma das estratégias de “testagem e refugo” mencionadas, deve-se proceder à análise dos fatores de risco para a ocorrência de infecção por *N. caninum* (principal via de transmissão, presença de cães, presença de outros reservatórios domésticos ou silvestres) (Haddad et al., 2005), bem como uma análise custo-benefício adaptada a cada exploração antes da escolha de qualquer uma destas estratégias (Dubey et al., 2007).

#### 2.10.4. Vacinação

Os custos relativos ao controlo da neosporose indicam que a vacinação pode ser a estratégia de controlo mais eficiente (Reichel e Ellis, 2009). Até ao momento, a única vacina licenciada, *Bovilis Neoguard*<sup>®</sup>, era composta por um lisado de taquizoítos, e esteve disponível em diversos países por vários anos (Barling et al., 2003). No entanto, esta vacina apenas demonstrou uma eficácia moderada em estudos de campo (Romero et al., 2004) e, num estudo desenvolvido por Weston et al., (2012), os autores sugeriram que a própria vacinação pode aumentar o risco de morte embrionária. Tendo esta vacina sido retirada do mercado, os produtores ficaram sem alternativas (Reichel et al., 2015). Assim sendo, uma vez que não existe nenhum tratamento eficaz contra este parasita (Aguado-Martínez et al., 2017), urge o desenvolvimento de vacinas eficazes para prevenir a infeção por *N. caninum* (Monney e Hemphill, 2014).

Idealmente, qualquer vacina desenvolvida contra a neosporose bovina deverá conferir proteção contra a infeção, doença clínica, aborto e evitar a transmissão vertical deste agente, o que implica que este medicamento imunológico consiga induzir uma resposta mediada por células não-fetopática (Goodswen et al., 2013), além disso deverá ser capaz de permitir a diferenciação entre os animais vacinados e os animais infetados naturalmente (Dubey et al., 2007). Segundo Nishikawa, (2017), uma vacina eficaz contra *N. caninum* deverá ser capaz de induzir uma resposta imune via linfócitos Th1 e Th2, uma vez que, em bovinos, os linfócitos Th1 desempenham um papel extremamente importante no desenvolvimento de uma imunidade protetora (Innes et al., 2002). Portanto, a indução da imunidade celular será a chave para o desenvolvimento de vacinas contra este parasita (Nishikawa, 2017).

Foram desenvolvidos diversos trabalhos experimentais com recurso a vacinas vivas e vacinas de subunidades. Até ao momento, a maioria dos estudos foram realizados através da vacinação de animais de laboratório, tendo sido apenas conduzidos alguns estudos em bovinos e ovinos (Hemphill et al., 2016). As vacinas vivas, baseadas em estirpes avirulentas de *N. caninum*, são consideradas como a medida profilática mais promissora e eficiente (Williams et al., 2007; Rojo-Montejo et al., 2009; Reichel et al., 2015), induzindo uma resposta imunitária humoral e celular (Nishikawa, 2017). Apesar de se verificar que o uso de vacinas vivas apresenta uma eficácia superior, comparativamente às vacinas de subunidades, a indústria farmacêutica mostra-se resistente à introdução destas vacinas vivas no mercado (Reichel et al., 2015). Um dos principais entraves à aprovação e introdução destas vacinas no mercado, assenta no seu potencial de infeção e manutenção do parasita em bovinos vacinados, havendo uma preocupação no que toca à possível reversão da virulência do agente vacinal (Goodswen et al., 2013; Hemphill et al., 2016; Nishikawa, 2017), bem como os elevados custos de produção e a sua reduzida vida útil (Hemphill et al., 2016). Além disso, a distribuição de uma vacina viva contra este agente, carecendo de azoto líquido, não é fácil (Goodswen et al., 2013). Adicionalmente, como as vacinas vivas podem provocar uma infeção crónica, existe o risco do ciclo de vida deste



parasita se completar, no caso de ocorrer a ingestão de tecidos de animais vacinados por H.D. (Reichel et al., 2015).

Mais recentemente, uma abordagem *in silico*, baseada na informação genómica e transcriptómica disponível sobre *N. caninum*, foi proposta para o desenvolvimento de uma vacina contra esta doença, com recurso a ferramentas bioinformáticas para avaliar a adequação de diferentes proteínas expressas para a produção de novas vacinas, identificando os antigénios que contêm epítomos para os linfócitos T e B por vacinologia reversa (Goodswen et al., 2014).

Segundo Nishikawa, (2017), tendo em conta o que se conhece da relação parasita-hospedeiro em fêmeas bovinas gestantes, a criação de uma vacina que possa ser inoculada durante a gestação é um objetivo irrealista, sendo o principal objetivo a vacinação destes animais antes da gestação, de modo a permitir um controlo adequado da neosporose. Contudo, Mazuz et al., (2021), verificaram que a vacinação de vacas seropositivas durante a gestação com um inóculo congelado-vivo apresentou um efeito benéfico na prevenção da ocorrência de aborto em diferentes explorações, além disso os resultados desse mesmo trabalho sugerem que a vacinação pode conferir um efeito protetor por mais do que uma gestação. No entanto, a eficácia da vacina utilizada foi diferente entre as diferentes explorações em estudo, assim sendo, o uso de uma vacina viva, para o controlo de aborto e redução do impacto económico deste, deve ser avaliado de forma individual para cada exploração.

## 3. Materiais e Métodos

### 3.1. Caracterização da amostra

Com o objetivo de proceder a uma amostragem tão aleatória quanto possível nas explorações de bovinos leiteiros e de cães na Ilha Terceira, de modo a estudar a infeção por *N. caninum* nesta ilha procedemos à seleção de explorações.

#### 3.1.1. Seleção das explorações

De acordo com a listagem das explorações existentes que entregaram leite na UNICOL – Cooperativa Agrícola, C.R.L. no mês de Outubro de 2021, procedeu-se à seleção, de forma aleatória, de 20 explorações de cada concelho da Ilha Terceira (Praia da Vitória e Angra do Heroísmo), perfazendo 40 explorações, num universo de 472 explorações, com recurso ao website “*Random.org*”.

Em cada concelho, foram selecionadas, através de contacto telefónico, 10 explorações com cães presentes e outras 10 sem a presença destes. Nas explorações selecionadas procedeu-se à recolha de amostras de sangue de 10 bovinos, de forma aleatória e, nas explorações com presença de cães, além da recolha de amostras de sangue de 10 bovinos, procedeu-se também à recolha de amostras de sangue dos cães.

### **3.1.2. Seleção dos canídeos em estudo**

Como referido anteriormente, procedeu-se à recolha de amostras de sangue dos cães provenientes das 20 explorações selecionadas aleatoriamente (n=31).

Em relação aos cães do meio urbano, foram recolhidas amostras de sangue, de forma aleatória, dos animais que deram entrada em duas clínicas veterinárias, uma de cada concelho (n=36).

## **3.2. Colheita das amostras**

### **3.2.1. Amostras de sangue dos bovinos**

A colheita de amostras de sangue dos bovinos das explorações selecionadas decorreu entre os meses de Novembro e Dezembro de 2021, tendo sido efetuada pelo autor sob a supervisão do Dr. João Fagundes. As amostras foram obtidas por punção venosa da veia coccígea média, tendo sido colhidos cerca de cinco mL de sangue para tubos de colheita individuais sem anticoagulante (Vacutainer®). No momento da colheita das amostras foram registados, num impresso fornecido pelo LRV, o número de identificação dos animais e o tipo de análise pretendida (Anexo 2). Posteriormente, procedeu-se à entrega das amostras biológicas no LRV. Após a sua receção, as amostras foram centrifugadas a 1500 rpm durante dez minutos, depois da obtenção dos soros, estes foram transferidos para novos tubos procedendo-se à sua congelação a -20°C.

### **3.2.2. Amostras de sangue dos cães**

A colheita de amostras de sangue dos cães presentes nas explorações selecionadas realizou-se durante o mês de Fevereiro de 2022, tendo sido efetuada pelo autor com a monitorização do Dr. João Fagundes. Estas amostras foram obtidas através de punção venosa da veia cefálica, tendo sido colhidos cerca de quatro mL de sangue para tubos de colheita individuais idênticos aos referidos anteriormente, devidamente identificados. Após a colheita das amostras, aguardaram-se cerca de quatro a seis horas, à temperatura ambiente, para ocorresse a formação do soro, e procedeu-se à entrega destas no LRV para posterior centrifugação a 1500 rpm durante dez minutos, após a conclusão os soros foram congelados a -20°C.

## **3.3. Recolha de dados das explorações**

### **3.3.1. Inquéritos**

O inquérito desenvolvido para os produtores (Anexo 3) foi realizado pelo autor após a recolha das amostras de sangue dos bovinos. Para a elaboração do inquérito referido anteriormente, foram consultados alguns artigos sobre a epidemiologia deste agente e as sugestões do professor Hélder Cortes e do Dr. João Fagundes.

A realização deste inquérito visou recolher informações acerca das explorações em geral, das medidas de manejo e fatores de risco associados ao aparecimento e disseminação de *N. caninum*.

A distribuição das explorações pela Ilha Terceira (Fig. 15) foi realizada através do programa “Google Maps”, com base nas coordenadas fornecidas pelo GPS do telemóvel do autor.

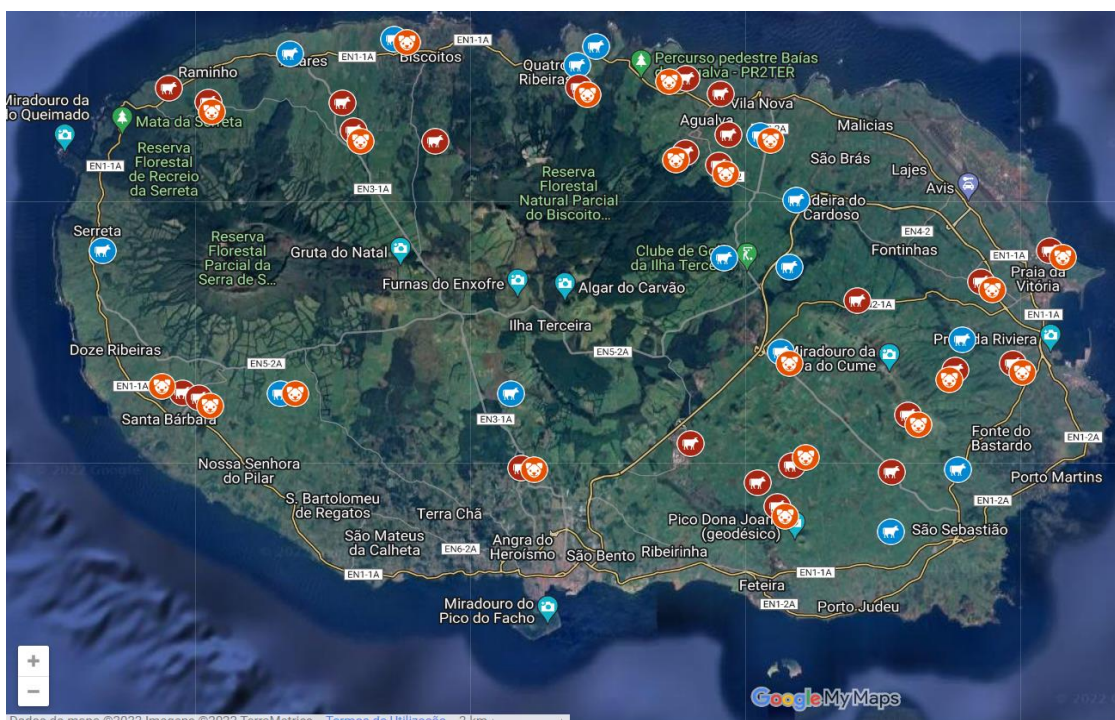


Figura 15. Distribuição das explorações em estudo. Vermelho – Explorações Positivas. Laranja – Explorações com cães presentes. Azul – Explorações Negativas

### 3.4. Métodos de ensaio

#### 3.4.1. ELISA para pesquisa de anticorpos anti-*Neospora caninum* em soro bovino

Para a pesquisa de anticorpos anti-*Neospora caninum* no soro bovino utilizou-se um kit comercial “CIVTEST® BOVIS NEOSPORA” (HIPRA®) baseado na técnica de ELISA indireto, com uma alta sensibilidade (96,1%) e especificidade (100%) (Alvarez-García et al., 2013), uma vez que este ensaio imunológico permite, de forma rápida e automatizada, a análise de um grande número de amostras, além de permitir o registo objetivo dos resultados (Ortega-Mora et al., 2006).

O protocolo foi efetuado segundo a instruções do fabricante (Anexo 4), o resultado das reações foi obtido através da leitura da densidade ótica (DO) das amostras com recurso a um leitor de microplacas (Bio-Rad Laboratories - Model 680 microplate reader), e a partir das DO dos controlos positivo e negativo, com recurso a um filtro 405 nm.

Os resultados apresentados foram validados (Tabela 1) e interpretados/classificados como positivos, duvidosos ou negativos (Tabela 2):

Tabela 1. Critérios de validação do ensaio ELISA. Adaptado de CIVTEST® BOVIS NEOSPORÁ – HIPRA.

$$DO_{(405)}\text{Média} > 0,9 \text{ e } \left( \frac{DO_{(405)} \text{ média do Controlo Positivo}}{DO_{(405)} \text{ média do Controlo Negativo}} \right) > 5,0$$

Tabela 2. Critérios para interpretação/classificação dos resultados obtidos. Adaptado de CIVTEST® BOVIS NEOSPORÁ – HIPRA.

$IRPC = \left[ \frac{DO_{(405)} \text{ da amostra} - DO_{(405)} \text{ média do Controlo Negativo}}{DO_{(405)} \text{ média do Controlo Positivo} - DO_{(405)} \text{ média do Controlo Negativo}} \right] \times 100$	
Valor de IRPC	Classificação
$IRPC \leq 6,0$	Negativo
$6,0 \leq IRPC \leq 10,0$	Duvidoso
$10 \leq IRPC$	Positivo

### 3.4.2. Imunofluorescência indireta (IFAT) para pesquisa de anticorpos anti-*Neospora caninum* em soro canino

Para a pesquisa de anticorpos anti-*Neospora caninum* no soro canino recorreu-se à técnica de imunofluorescência indireta (IFAT). Foram utilizadas lâminas previamente preparadas pelo professor Hélder Cortes, no Laboratório de Parasitologia Victor Caeiro da Universidade de Évora. Os taquizoítos de *N. caninum* usados para revestir as lâminas foram multiplicados por passagens contínuas em culturas de células Vero, incubadas a 37°C. Os taquizoítos foram colhidos após três/quatro dias após infeção (uma vez que nesta fase, a maior parte das células encontram-se confluentes, bem como os taquizoítos encontravam-se intracelular). De seguida, procedeu-se à retirada e transferência da monocamada celular, da totalidade da cultura celular, para o sobrenadante tendo passado a suspensão resultante por uma seringa de calibre 27 G, de modo a libertar os taquizoítos das células, seguido de uma centrifugação a 770 G por 15 min, a 4°C, o sedimento resultante foi ressuscitado em tampão fosfato-salino (PBS). Para separar os taquizoítos dos diferentes detritos celulares, utilizaram-se colunas feitas com recurso a pó de celulose Whatman CF 11, pelo método descrito por Dempster (1984). Os taquizoítos purificados foram prontamente usados na preparação das lâminas para IFAT.

A preparação das lâminas para IFAT baseou-se na técnica proposta por Shkap et al., (2002) que, de forma sucinta, assenta na lavagem e posterior suspensão dos taquizoítos numa solução de formaldeído a 4% em PBS, em gelo, por 30 minutos. Os taquizoítos fixados foram lavados três vezes, com PBS, de modo a remover o formaldeído, e o sedimento foi colocado numa suspensão em um mL de PBS. Estas formas parasitárias foram contadas e diluídas em PBS até se alcançar uma concentração final de  $2 \times 10^6$  taquizoítos/mL, distribuídas pelas lâminas em gotas de 6 µL, e posteriormente secas a 37°C e fixadas em acetona (-20°C) por dez minutos.

O protocolo de IFAT usado encontra-se descrito no Anexo 5. As diluições utilizadas foram a de 1:25 (Lindsay et al., 1999a; Silva et al., 2007) e a de 1:50 (Björkman e Ugglá, 1999; Cheadle

et al., 1999a; Ortuño et al., 2002; Waap et al., 2017), recorreu-se a estas duas diluições uma vez que ainda não existe nenhuma diluição definida como limiar de positividade (Silva et al., 2007; Waap et al., 2017). O controlo positivo e o controlo negativo foram gentilmente fornecidos pela Universidade de Berna (Universität Bern, Vetsuisse-Fakultät). Foi utilizado, como anticorpo anti-espécie, o anticorpo policlonal ovino anti-cão IgG FITC AbD Serotec® AA132F, lote 160210, (Bio-Rad Laboratories®). Finalizado o protocolo, procedeu-se à observação das lâminas com recurso ao microscópio ótico de fluorescência OLYMPUS BX41 (Model BX41TF).

### 3.5. Análise Estatística

Para o registo e compilação dos dados reunidos utilizou-se o programa *Microsoft Excel* 2016® e para o tratamento estatístico destes dados usou-se o *software* “R” versão 4.2.0 (<https://www.r-project.org/>).

Para avaliar a associação entre as variáveis qualitativas e a presença de animais positivos nas explorações utilizou-se o teste do chi quadrado de Pearson ou teste exato de Fisher em função da tabela de valores esperados.

Para a comparação de variáveis quantitativas e a presença de animais positivos nas explorações, analisou-se primeiro a distribuição com o teste de Spearman, sendo que, pelo facto da distribuição destas variáveis não ser normal, utilizou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Foram considerados como estatisticamente significativos os testes com valor de  $p < 0,05$ .

A prevalência real de infeção nos bovinos foi calculada tendo em conta os valores de especificidade e sensibilidade do teste de diagnóstico utilizado (Rogan e Gladen, 1978), bem como os intervalos de confiança (Reiczigel et al., 2010), para tal recorreu-se ao programa “EpiTools” (Sergeant, 2018). A prevalência real de infeção nos canídeos foi calculada com recurso a este mesmo programa assumindo que se recorreu a um teste perfeito (IFAT).

## 4. Resultados

Os valores de prevalência de infeção por *Neospora caninum* encontrados nos bovinos foram de 14,83% (95% CI: 11,62% - 18,75%) a nível individual e de 62,43% (95% CI: 46,41% - 76,64%) a nível de exploração.

Os valores de prevalência calculados para a infeção por este agente nos cães em estudo foram de 64,52% (95% CI: 46,95% - 78,88%), em cães do meio rural, e 8,33% (95% CI: 2,87% - 21,83%) em cães do meio urbano.

A prevalência de *N. caninum*, em canídeos, do concelho da Praia da Vitória foi de 88,24% (95% CI: 65,66% - 96,71%), muito superior à observada em Angra do Heroísmo, 35,71% (95% CI: 16,34% - 61,24%), no entanto esta diferença não foi considerada estatisticamente significativa ( $p=0,311$ ).

Verificou-se um maior risco de infeção nos cães de exploração (rurais) em comparação com cães urbanos ( $p=1,419 \times 10^{-9}$ ). O tipo de local de alimentação ( $p=0,01139$ ), e tipo de

infraestrutura associada ( $p=0,006303$ ), tiveram uma associação positiva com a presença de cães infectados por este agente.

Não se verificou nenhuma relação estatisticamente significativa entre a presença de cães na exploração e a positividade das explorações ( $p=0,3332$ ), bem como entre a presença de cães positivos com a positividade das explorações ( $p=0,733$ ).

Após a análise dos dados recolhidos, foi possível observar que 29 dos 40 produtores (72,5%) afirmaram desconhecer o ciclo de vida deste parasita, apesar de 27 dos produtores (67,5%) dizerem já ter ouvido falar de neosporose.

Os resultados da análise das variáveis qualitativas encontram-se resumidos na Tabela 3:

Tabela 3. Resultados da análise estatística das variáveis qualitativas.

Variáveis em Estudo		Explorações/Animais Positivos		Explorações/Animais Negativos		Valor de p (Teste Exato de Fisher)
		n	(%)	n	(%)	
<b>Abortos no último ano X cães positivos</b>	Sim	12	42,9	16	57,1	0,06268
	Não	1	8,3	11	91,7	0,06268
<b>Local de Alimentação X Cães positivos</b>	Pastagem	2	11,1	16	88,9	<b>0,01139</b>
	Manjedoura	1	100	0	0	<b>0,01139</b>
	Misto	11	47,6	10	52,4	<b>0,01139</b>
<b>Local de Parto X Cães positivos</b>	Campo	11	28,9	27	71,1	0,1
	Maternidade	2	100	0	0,0	0,1
<b>Sistema de Ordenha X Cães positivos</b>	Sala de Ordenha	8	50,0	8	50,0	0,08
	Máquina de ordenha móvel	5	20,8	19	79,2	0,08
<b>Tipo de Infraestruturas X Cães positivos</b>	Parque de Alimentação	9	60,0	6	40,0	<b>0,006303</b>
	Pastoreio Permanente	4	16,0	21	84,0	<b>0,006303</b>
<b>Maneio dos anexos fetais X Cães Positivos</b>	Enterram	6	31,6	13	68,4	1
	Deixam na Pastagem	7	33,3	14	66,7	1
<b>Presença de cães na exploração X Exp. Positiva</b>	Sim	6	37,5	10	62,5	0,3332
	Não	14	58,3	10	41,7	0,3332
<b>Presença de cães positivos na exploração X Exp. Positiva</b>	Sim	17	63,0	10	37,0	0,733
	Não	7	53,8	6	46,2	0,733
<b>Maneio dos anexos fetais X Exp. Positiva</b>	Enterram	10	52,6	9	47,4	0,5197
	Deixam na pastagem	14	66,7	7	33,3	0,5197

<b>Abortos no último ano X Exp. Positiva</b>	Sim	17	70,8	11	68,8	1
	Não	7	29,2	5	31,2	1
<b>Outros cães com acesso à exploração X Exp. Positiva</b>	Sim	22	66,7	15	33,3	1
	Não	15	59,5	1	40,5	1
<b>Local de alimentação X Exp. Positiva</b>	Pastagem	13	72,2	5	27,8	0,2446
	Manjedoura	1	100	0	0,0	0,2446
	Misto	10	47,6	11	52,4	0,2446
<b>Local de Parto X Exp. Positiva</b>	Campo	22	57,9	16	42,1	0,5077
	Maternidade	2	100	0	0	0,5077
<b>Sistema de Ordenha X Exp. Positiva</b>	Sala de Ordenha	9	56,2	7	43,8	0,7501
	Máquina de ordenha móvel	15	62,5	9	37,5	0,7501
<b>Tipo de infraestruturas X Exp. Positiva</b>	Parque de Alimentação	8	53,3	7	46,7	0,5267
	Pastoreio Permanente	16	64,0	9	36,0	0,5267
<b>Abortos no último ano X Presença de cães</b>	Sim	15	53,6	13	46,4	0,7311
	Não	5	41,7	7	58,3	0,7311
<b>Cães rurais vs. cães urbanos</b>	Cães rurais	20	64,5	11	35,5	<b>0,000001419</b>
	Cães urbanos	3	8,3	33	91,7	<b>0,000001419</b>

Os resultados da análise das variáveis quantitativas encontram-se representados na Tabela 4:

Tabela 4. Resultados da análise estatística das variáveis quantitativas

<b>Variáveis em Estudo</b>	<b>Explorações Positivas</b>		<b>Explorações Negativas</b>		<b>Valor de p</b>
	<b>Mediana</b>	<b>IQR</b>	<b>Mediana</b>	<b>IQR</b>	
I.A./gestação	2,6	1,045	1,8	0,45	<b>0,033</b>
Intervalo entre partos	421,5	52,75	430	29,5	0,07699
Nº médio de lactações	3,35	0,9	3,6	1,05	0,05843

Após a análise estatística foi possível observar que as explorações positivas (com animais positivos) em estudo apresentavam um maior número de I.A. (inseminações artificiais) comparativamente às explorações consideradas negativas, sendo este resultado estatisticamente significativo ( $p=0,033$ ).

## 5. Discussão

No presente trabalho, a prevalência individual de infeção por este parasita em bovinos foi de 14,83%. Já a prevalência de infeção, nas explorações estudadas foi de 62,43%. Este valor de prevalência a nível das explorações é semelhante aos valores já referidos por outros trabalhos epidemiológicos em explorações de bovinos leiteiros (Paré et al., 1997; Stenlund et al., 1999; Venturini et al., 1999; Kashiwazaki et al., 2001; García-Vázquez et al., 2002; Kashiwazaki et al., 2004; Frössling et al., 2006).

Em Portugal, a prevalência observada por Canada et al., (2004), em explorações leiteiras, foi de 28% num grupo de animais sem história de aborto, e de 46% em animais com história de aborto. Já Barbosa et al., (2019) observaram uma prevalência individual de 16,3% de animais positivos em explorações leiteiras da região Norte de Portugal, no entanto os valores de prevalência individual variaram entre os 0% e os 60,2%. Nos Açores, segundo Pinto et al., (2003) citado por Benevides, (2005), foi possível chegar a uma prevalência provisória de 36%, de infeção por *N. caninum*, na Ilha de São Miguel. Na Ilha Terceira, segundo Benevides, (2005), a prevalência encontrada, no único trabalho que tivemos conhecimento, foi de 64%, o que ainda hoje se observa.

Quanto à infeção por este parasita nos canídeos em estudo, foram observadas prevalências na ordem dos 64,52% e 8,33%, em canídeos rurais e canídeos urbanos, respetivamente. A prevalência observada nos cães do meio rural é superior às relatadas por trabalhos anteriores (Wouda et al., 1999b; Collantes-Fernández et al., 2008; Regidor-Cerrillo et al., 2010), sendo apenas superada pelo estudo desenvolvido por Antony e Williamson, (2003), que referiram uma prevalência de 97,5% em cães de explorações leiteiras. Já a prevalência encontrada nos cães de meios urbanos encontra-se de acordo com aquilo que é relatado por outros autores (Trees et al., 1993; Wouda et al., 1999b; Collantes-Fernández et al., 2008).

O facto de a prevalência de infeção por *N. caninum* ser superior em cães de exploração, comparativamente aos cães de zonas urbanas, é algo que se encontra em concordância com o referido por outros autores (Sawada et al., 1998; Wouda et al., 1999b; Basso et al., 2001b; Collantes-Fernández et al., 2008; Maia et al., 2014; Sloan et al., 2017; Mosallanejad et al., 2018).

Em Portugal, no trabalho de Waap et al., (2017), os autores chegaram a uma prevalência de 32,5% em cães, já Maia et al., (2014) encontraram uma prevalência de 7,9% em cães por cELISA.

Todavia, ao comparar os resultados de vários estudos de prevalência de anticorpos anti-*N. caninum* deve-se ter em consideração o uso das diferentes técnicas de diagnóstico serológico, as diferentes idades dos animais, o tamanho da amostra e tipo do população animal em estudo (Dubey et al., 2007).

Neste trabalho a técnica serológica utilizada para a deteção de anticorpos anti-*N. caninum* nos cães foi a IFAT. Esta técnica tem sido amplamente usada para o diagnóstico de infeção por este parasita em cães, sendo considerada a técnica de referência para tal (Björkman



e Uggla, 1999; Hemphill e Gottstein, 2000; Capelli et al., 2006; Silva et al., 2007), além disso é considerada uma técnica mais específica que ELISA, uma vez que o uso de antígeno total de taquizoítos como revestimento das placas ELISA pode levar a que ocorram reações cruzadas outros protozoários Apicomplexa (Björkman e Hemphill, 1998; Silva et al., 2007). As diluições utilizadas para a análise serológica foram a de 1:25 e de 1:50, apesar de diversos autores considerarem esta última a mais apropriada como limiar de positividade em cães (Björkman e Uggla, 1999; Silva et al., 2007; Wang et al., 2016). Neste estudo, os resultados de algumas amostras tiveram uma interpretação difícil, uma vez que alguns dos soros apresentavam uma reação apical com fluorescência periférica incompleta dos taquizoítos fixados, este achado, já esperado, foi semelhante ao descrito por Paré et al., (1995). Waap et al., (2017) reforça a necessidade de reavaliar os valores de limite de positividade e harmonização dos reagentes utilizados, bem como os procedimentos para a preparação das lâminas.

Segundo o trabalho conduzido por Benevides, (2005), 64,7% dos produtores inquiridos afirmaram possuir cães, isto, conjugando o facto de existirem algumas populações de cães errantes e de existirem tutores que não são capazes de deter os seus animais nos limites das suas propriedades, torna a presença de cães um fator de risco para a entrada de *N. caninum* nas explorações. Uma vez que, na realidade açoriana, as parcelas são de tamanho reduzido sem qualquer barreira física capaz de impedir o trânsito livre de cães (errantes ou não), associado ao facto de a ideia de emparcelamento não ter tido ainda sucesso na Terceira, pelo que numa determinada área existem diferentes proprietários com várias parcelas, o controlo do acesso dos cães, que podem cobrir grandes áreas num só dia, entre um a 24 km<sup>2</sup> (Meek, 1999; Sparkes et al., 2014), aos terrenos adjacentes torna-se muito complicado, sendo tudo isto agravado pelo facto de mais de metade dos produtores inquiridos desconhecerem o ciclo de vida deste parasita.

Embora a presença de cães na exploração não tenha sido considerada um fator de risco estatisticamente significativo para a positividade das explorações ( $p=0,3332$ ), tendo em conta o panorama geral da Ilha Terceira e os conhecimentos da epidemiologia deste parasita, deve-se ter em atenção que o facto de, não ter cão não impede o aparecimento de bovinos seropositivos nas diferentes explorações, uma vez que foram encontrados de animais positivos em explorações sem cães, além do facto que estes últimos podem andar livremente entre os diferentes terrenos, permitindo assim a disseminação deste agente. Além disso, apesar de neste estudo não se ter encontrado uma associação estatisticamente significativa entre a presença de cães nas explorações e a ocorrência de abortos ( $p=0,7311$ ) e entre a presença de cães positivos nas explorações e a ocorrência de abortos ( $p=0,06268$ ), diversos estudos sugerem uma associação entre a ocorrência de abortos e a presença de cães nas explorações (Anderson et al., 1997; Bartels et al., 1999; Ould-Amrouche et al., 1999; Schares et al., 2003). A razão pela qual estas três variáveis não foram consideradas estatisticamente significativas pode advir do reduzido tamanho das amostras de bovinos e de canídeos, à semelhança do que foi descrito por Manca et al., (2022), que ainda refere que a presença de animais positivos em explorações sem

a presença de cães reforça a ideia de que a infeção dos bovinos requer a presença de um hospedeiro definitivo, mas que esta prossegue e dissemina-se independentemente da presença deste pela transmissão vertical.

Relativamente às variáveis “Tipo de infraestruturas associadas” e “Local de alimentação” e, a sua relação com a positividade dos cães em estudo, estas foram consideradas estatisticamente significativas ( $p=0,006303$ ) e ( $p=0,01139$ ), respetivamente. Uma possível explicação para estes resultados assenta no facto de que os bovinos ao deslocarem-se sempre para o mesmo local para se alimentarem aumenta o tempo de contacto com os cães, que geralmente permanecem mais tempo perto destes locais, tornando o acesso destes às membranas fetais mais fácil (Barling et al., 2001). Além disso, embora neste estudo estas mesmas variáveis, quando analisadas em função da presença de animais positivos na exploração, não foram consideradas estatisticamente significativas, os animais cuja alimentação ou uma parte dela é fornecida na manjedoura têm um maior risco de se infetarem, uma vez que os hospedeiros definitivos como os cães, por exemplo, podem contaminar as manjedouras com oocistos ou ainda contaminar os alimentos antes de serem armazenados ou, nos seus locais de armazenamento (Bartels et al., 1999; Th Dijkstra et al., 2002b; Hobson et al., 2005).

Neste estudo foi possível observar que as explorações positivas apresentavam um maior número de I.A. comparativamente às explorações consideradas negativas, sendo esta diferença estatisticamente significativa ( $p=0,033$ ), esta diferença pode ser provocada pelos efeitos nefastos da infeção por este parasita sobre o *conceptus*, provocando perdas gestacionais precoces e aumento da taxa de retorno ao cio (Waldner et al., 1998, 2001; Muñoz-Zanzi et al., 2004; Waldner, 2005) aumentando assim o número de I.A. necessárias e o intervalo entre partos, no entanto foi possível verificar que as explorações positivas têm um número de dias de intervalo entre partos inferior comparativamente às explorações negativas, embora não seja uma diferença estatisticamente significativa ( $p=0,07699$ ), uma explicação possível para este caso pode dever-se ao facto de existirem mais problemas de fertilidade associados à infeção por este parasita, conduzindo assim a um refugo precoce dos animais e, por conseguinte, a uma diminuição do intervalo entre partos nestas explorações.

## 6. Conclusão

Infelizmente ainda não existem vacinas suficientemente eficazes contra *N. caninum*. Assim, o controlo da neosporose depende de medidas de manejo aliadas aos meios de diagnóstico disponíveis (Reichel et al., 2015; McAllister, 2016). Segundo Dubey et al., (2007), os métodos de diagnóstico serológicos são, até ao momento, o meio mais adequado para a tomada de decisão no controlo desta doença. Os valores do limiar de deteção dos testes são de extrema importância, uma vez que estes podem influenciar significativamente o sucesso dos programas de controlo implementados (Campero et al., 2018), por exemplo, numa exploração na qual existe um reduzido número de animais infetados por este agente e cujo o objetivo é eliminar todos os infetados, o uso de valores de limiares de deteção com diluições mais baixas permite que existam

menos animais verdadeiramente infetados diagnosticados como negativos (menos falsos negativos), permitindo assim refugar todos os animais infetados, sob pena de se incluírem e eliminarem alguns animais negativos (falsos positivos) em prol dos objetivos definidos pela exploração.

O controlo da neosporose deve incidir na interrupção da transmissão entre cães e bovinos. Deve-se restringir o acesso dos cães aos locais de armazenamento dos alimentos e fontes de abeberamento dos bovinos. De modo a evitar a continuação do ciclo de vida deste parasita é de extrema importância a remoção de restos de membranas fetais, fetos abortados e vitelos mortos de forma a impedir a sua ingestão pelos cães. Além disso, devem ser removidas todas as carcaças de bovinos mortos de maneira a que os cães não possam acedê-las. A população de cães errantes também deve ser controlada, uma vez que possibilita a disseminação deste agente. Posto isto, e uma vez que na realidade dos Açores não existem barreiras físicas que sejam capazes de impedir o livre trânsito de cães entre as explorações, é recomendado que estes estejam em áreas delimitadas que permitam restringir o seu acesso aos locais onde os bovinos pastoreiam bem como aos locais de armazenamento de alimentos e de abeberamento. Além disso, o uso de vedações, nas explorações, que impeçam a entrada de cães é uma medida muito importante (Dubey et al., 2007), uma vez que cães introduzidos recentemente numa exploração excretam nas fezes uma maior quantidade de oocistos, podendo provocar um surto de abortos numa exploração indemne ou mesmo numa exploração onde a doença já é endémica (Th Dijkstra et al., 2002b).

De forma a mitigar a ocorrência de transmissão vertical, devem-se realizar rotineiramente despistes serológicos de modo a identificar as fêmeas infetadas com *N. caninum* e proceder à sua eliminação das explorações, uma vez que têm grande probabilidade de transmitir a infeção aos seus descendentes, caso estes animais não possam ser rapidamente refugados, devem ser inseminados com sémen de carne, evitando a manutenção da sua descendência na exploração, ou realizar-se transferência de embriões em animais cujo valor genético o justifique utilizando recetoras seronegativas. Outras medidas de controlo que podem ser tomadas passam pela testagem dos animais antes da sua entrada na exploração, compra de novilhas de substituição provenientes de exploração indemnes de neosporose (Dubey et al., 2007).

Em suma, apesar de todas as sugestões feitas anteriormente, existe uma grande necessidade de formação e sensibilização dos produtores para aquilo que são os inúmeros impactos que a neosporose provoca na produtividade de uma exploração, seja ela de bovinos de leite ou de bovinos de carne, e os riscos que implica a presença de cães nas explorações, não só para o próprio produtor e tutor dos cães como também para os produtores com terrenos nas áreas circundantes. Além disso, também é fundamental alertar os tutores de cães que algumas tendências recentes, na alimentação de cães com carne crua, podem levar ao aparecimento de animais, sem qualquer relação com bovinos, infetados com *Neospora caninum*.

## Bibliografía

- Agerholm, J.S., Bendixen, C., Andersen, O., Arnbjerg, J., 2001. Complex vertebral malformation in holstein calves. *J. Vet. Diagn. Investig. Off. Publ. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagn. Inc* 13, 283–289. <https://doi.org/10.1177/104063870101300401>
- Aguado-Martínez, A., Alvarez-García, G., Arnaiz-Seco, I., Innes, E., Ortega-Mora, L.M., 2005. Use of avidity enzyme-linked immunosorbent assay and avidity Western blot to discriminate between acute and chronic *Neospora caninum* infection in cattle. *J. Vet. Diagn. Investig. Off. Publ. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagn. Inc* 17, 442–450. <https://doi.org/10.1177/104063870501700506>
- Aguado-Martínez, A., Basto, A.P., Leitão, A., Hemphill, A., 2017. *Neospora caninum* in non-pregnant and pregnant mouse models: cross-talk between infection and immunity. *Int. J. Parasitol.* 47, 723–735. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2017.09.001>
- Albuja, C., Ortiz, O., López, C., Hernández-Cerón, J., Albuja, C., Ortiz, O., López, C., Hernández-Cerón, J., 2019. Economic impact of pregnancy loss in an intensive dairy farming system. *Vet. México OA* 6, 1–8. <https://doi.org/10.22201/fmvz.24486760e.2019.1.572>
- Almería, S., 2013. *Neospora caninum* and Wildlife. *ISRN Parasitol.* 2013, e947347. <https://doi.org/10.5402/2013/947347>
- Almería, S., Araujo, R., Tuo, W., López-Gatius, F., Dubey, J.P., Gasbarre, L.C., 2010. Fetal death in cows experimentally infected with *Neospora caninum* at 110 days of gestation. *Vet. Parasitol.* 169, 304–311. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.12.044>
- Almería, S., Araujo, R.N., Darwich, L., Dubey, J.P., Gasbarre, L.C., 2011. Cytokine gene expression at the materno-foetal interface after experimental *Neospora caninum* infection of heifers at 110 days of gestation. *Parasite Immunol.* 33, 517–523. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2011.01307.x>
- Almería, S., De Marez, T., Dawson, H., Araujo, R., Dubey, J.P., Gasbarre, L.C., 2003. Cytokine gene expression in dams and fetuses after experimental *Neospora caninum* infection of heifers at 110 days of gestation. *Parasite Immunol.* 25, 383–392. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.2003.00645.x>
- Almería, S., Ferrer, D., Pabón, M., Castellà, J., Mañas, S., 2002. Red foxes (*Vulpes vulpes*) are a natural intermediate host of *Neospora caninum*. *Vet. Parasitol.* 107, 287–294. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(02\)00162-0](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(02)00162-0)
- Almería, S., López-Gatius, F., García-Ispuerto, I., Nogareda, C., Bech-Sàbat, G., Serrano, B., Santolaria, P., Yániz, J.L., 2009. Effects of crossbreed pregnancies on the abortion risk of *Neospora caninum*-infected dairy cows. *Vet. Parasitol., Special Section: EVPC 2008: Veterinary parasitology and climate change* 163, 323–329. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.04.026>
- Almería, S., Serrano-Pérez, B., López-Gatius, F., 2017. Immune response in bovine neosporosis: Protection or contribution to the pathogenesis of abortion. *Microb. Pathog.* 109, 177–182. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.05.042>
- Al-Qassab, S.E., Reichel, M.P., Ellis, J.T., 2010. On the Biological and Genetic Diversity in *Neospora caninum*. *Diversity* 2, 411–438. <https://doi.org/10.3390/d2030411>
- Alvarez-García, G., Collantes-Fernández, E., Costas, E., Rebordosa, X., Ortega-Mora, L.M., 2003. Influence of age and purpose for testing on the cut-off selection of serological methods in bovine neosporosis. *Vet. Res.* 34, 341–352. <https://doi.org/10.1051/vetres:2003009>
- Alvarez-García, G., García-Culebras, A., Gutiérrez-Expósito, D., Navarro-Lozano, V., Pastor-Fernández, I., Ortega-Mora, L.M., 2013. Serological diagnosis of bovine neosporosis: a comparative study of commercially available ELISA tests. *Vet. Parasitol.* 198, 85–95. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.07.033>

- Alvarez-García, G., Pereira-Bueno, J., Gómez-Bautista, M., Ortega-Mora, L.M., 2002. Pattern of recognition of *Neospora caninum* tachyzoite antigens by naturally infected pregnant cattle and aborted fetuses. *Vet. Parasitol.* 107, 15–27. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(02\)00091-2](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(02)00091-2)
- Anderson, M.L., Andrianarivo, A.G., Conrad, P.A., 2000. Neosporosis in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 60–61, 417–431. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(00\)00117-2](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(00)00117-2)
- Anderson, M.L., Blanchard, P.C., Barr, B.C., Dubey, J.P., Hoffman, R.L., Conrad, P.A., 1991. Neospora-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 198, 241–244.
- Anderson, M.L., Reynolds, J.P., Rowe, J.D., Sverlow, K.W., Packham, A.E., Barr, B.C., Conrad, P.A., 1997. Evidence of vertical transmission of *Neospora* sp infection in dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 210, 1169–1172.
- Andreotti, R., Locatelli-Dittrich, R., Soccol, V.T., Paiva, F., 2003. Diagnóstico e controle da neosporose em bovinos. - Portal Embrapa 51.
- Andreotti, R., Oliveira, J.M., Silva, E.A.E., Oshiro, L.M., Matos, M. de F.C., 2006. Occurrence of *Neospora caninum* in dogs and its correlation with visceral leishmaniasis in the urban area of Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Vet. Parasitol.* 135, 375–379. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.10.011>
- Andrianarivo, A.G., Barr, B.C., Anderson, M.L., Rowe, J.D., Packham, A.E., Sverlow, K.W., Conrad, P.A., 2001. Immune responses in pregnant cattle and bovine fetuses following experimental infection with *Neospora caninum*. *Parasitol. Res.* 87, 817–825. <https://doi.org/10.1007/s004360100442>
- Antonello, A.M., Pivoto, F.L., Camillo, G., Braunig, P., Sangioni, L.A., Pompermayer, E., Vogel, F.S.F., 2012. The importance of vertical transmission of *Neospora* sp. in naturally infected horses. *Vet. Parasitol.* 187, 367–370. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.02.005>
- Antony, A., Williamson, N.B., 2003. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs of rural or urban origin in central New Zealand. *N. Z. Vet. J.* 51, 232–237. <https://doi.org/10.1080/00480169.2003.36372>
- Atkinson, R., Harper, P.A., Reichel, M.P., Ellis, J.T., 2000. Progress in the serodiagnosis of *Neospora caninum* infections of cattle. *Parasitol. Today Pers. Ed* 16, 110–114. [https://doi.org/10.1016/s0169-4758\(99\)01604-x](https://doi.org/10.1016/s0169-4758(99)01604-x)
- Baillargeon, P., Fecteau, G., Paré, J., Lamothe, P., Sauvé, R., 2001. Evaluation of the embryo transfer procedure proposed by the International Embryo Transfer Society as a method of controlling vertical transmission of *Neospora caninum* in cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 218, 1803–1806. <https://doi.org/10.2460/javma.2001.218.1803>
- Barber, J.S., Trees, A.J., 1998. Naturally occurring vertical transmission of *Neospora caninum* in dogs. *Int. J. Parasitol.* 28, 57–64. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(97\)00171-9](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(97)00171-9)
- Barber, J.S., Trees, A.J., 1996. Clinical aspects of 27 cases of neosporosis in dogs. *Vet. Rec.* 139, 439–443. <https://doi.org/10.1136/vr.139.18.439>
- Barbosa, D.<sup>a</sup> A., Pereira, A., Afonso, C., 2019. A seroprevalência de *Neospora caninum* em Explorações Pecuárias Portuguesas. *Rev. Agros* 18–19.
- Barling, K.S., Lunt, D.K., Graham, S.L., Choromanski, L.J., 2003. Evaluation of an inactivated *Neospora caninum* vaccine in beef feedlot steers. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 222, 624–627. <https://doi.org/10.2460/javma.2003.222.624>
- Barling, K.S., McNeill, J.W., Paschal, J.C., McCollum, F.T., Craig, T.M., Adams, L.G., Thompson, J.A., 2001. Ranch-management factors associated with antibody seropositivity for *Neospora caninum* in consignments of beef calves in Texas, USA. *Prev. Vet. Med.* 52, 53–61. [https://doi.org/10.1016/s0167-5877\(01\)00233-1](https://doi.org/10.1016/s0167-5877(01)00233-1)

- Barling, K.S., McNeill, J.W., Thompson, J.A., Paschal, J.C., McCollum, F.T., Craig, T.M., Adams, L.G., 2000a. Association of serologic status for *Neospora caninum* with postweaning weight gain and carcass measurements in beef calves. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 217, 1356–1360. <https://doi.org/10.2460/javma.2000.217.1356>
- Barling, K.S., Sherman, M., Peterson, M.J., Thompson, J.A., McNeill, J.W., Craig, T.M., Adams, L.G., 2000b. Spatial associations among density of cattle, abundance of wild canids, and seroprevalence to *Neospora caninum* in a population of beef calves. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 217, 1361–1365. <https://doi.org/10.2460/javma.2000.217.1361>
- Barna, F., Debache, K., Vock, C.A., Küster, T., Hemphill, A., 2013. In Vitro Effects of Novel Ruthenium Complexes in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* Tachyzoites. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 5747–5754. <https://doi.org/10.1128/AAC.02446-12>
- Barr, B.C., Anderson, M.L., Blanchard, P.C., Daft, B.M., Kinde, H., Conrad, P.A., 1990. Bovine fetal encephalitis and myocarditis associated with protozoal infections. *Vet. Pathol.* 27, 354–361. <https://doi.org/10.1177/030098589002700508>
- Barr, B.C., Anderson, M.L., Dubey, J.P., Conrad, P.A., 1991a. *Neospora*-like protozoal infections associated with bovine abortions. *Vet. Pathol.* 28, 110–116. <https://doi.org/10.1177/030098589102800202>
- Barr, B.C., Anderson, M.L., Sverlow, K.W., Conrad, P.A., 1995. Diagnosis of bovine fetal *Neospora* infection with an indirect fluorescent antibody test. *Vet. Rec.* 137, 611–613.
- Barr, B.C., Anderson, M.L., Woods, L.W., Dubey, J.P., Conrad, P.A., 1992. *Neospora*-like protozoal infections associated with abortion in goats. *J. Vet. Diagn. Investig. Off. Publ. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagn. Inc* 4, 365–367. <https://doi.org/10.1177/104063879200400331>
- Barr, B.C., Conrad, P.A., Breitmeyer, R., Sverlow, K., Anderson, M.L., Reynolds, J., Chauvet, A.E., Dubey, J.P., Ardans, A.A., 1993. Congenital *Neospora* infection in calves born from cows that had previously aborted *Neospora*-infected fetuses: four cases (1990-1992). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 202, 113–117.
- Barr, B.C., Conrad, P.A., Dubey, J.P., Anderson, M.L., 1991b. *Neospora*-like encephalomyelitis in a calf: pathology, ultrastructure, and immunoreactivity. *J. Vet. Diagn. Investig. Off. Publ. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagn. Inc* 3, 39–46. <https://doi.org/10.1177/104063879100300109>
- Barr, B.C., Conrad, P.A., Sverlow, K.W., Tarantal, A.F., Hendrickx, A.G., 1994. Experimental fetal and transplacental *Neospora* infection in the nonhuman primate. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 71, 236–242.
- Bartels, C.J., Wouda, W., Schukken, Y.H., 1999. Risk factors for *Neospora caninum*-associated abortion storms in dairy herds in The Netherlands (1995 to 1997). *Theriogenology* 52, 247–257. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00126-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00126-0)
- Bartels, C.J.M., Arnaiz-Seco, J.I., Ruiz-Santa-Quitera, A., Björkman, C., Frössling, J., von Blumröder, D., Conraths, F.J., Schares, G., van Maanen, C., Wouda, W., Ortega-Mora, L.M., 2006a. Supranational comparison of *Neospora caninum* seroprevalences in cattle in Germany, The Netherlands, Spain and Sweden. *Vet. Parasitol.* 137, 17–27. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.12.016>
- Bartels, C.J.M., Arnaiz-Seco, J.I., Ruiz-Santa-Quitera, A., Björkman, C., Frössling, J., von Blumröder, D., Conraths, F.J., Schares, G., van Maanen, C., Wouda, W., Ortega-Mora, L.M., 2006b. Supranational comparison of *Neospora caninum* seroprevalences in cattle in Germany, The Netherlands, Spain and Sweden. *Vet. Parasitol.* 137, 17–27. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.12.016>
- Bartels, C.J.M., van Maanen, C., van der Meulen, A.M., Dijkstra, T., Wouda, W., 2005. Evaluation of three enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies

- to *Neospora caninum* in bulk milk. *Vet. Parasitol.* 131, 235–246.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.05.011>
- Bartley, P.M., Kirvar, E., Wright, S., Swales, C., Esteban-Redondo, I., Buxton, D., Maley, S.W., Schock, A., Rae, A.G., Hamilton, C., Innes, E.A., 2004. Maternal and fetal immune responses of cattle inoculated with *Neospora caninum* at mid-gestation. *J. Comp. Pathol.* 130, 81–91. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2003.08.003>
- Bartova, E., Machacova, T., Sedlak, K., Budikova, M., Mariani, U., Veneziano, V., 2015. Seroprevalence of antibodies of *Neospora* spp. and *Toxoplasma gondii* in horses from southern Italy. *Folia Parasitol. (Praha)* 62, 2015.043.  
<https://doi.org/10.14411/fp.2015.043>
- Basso, W., Schares, S., Minke, L., Bärwald, A., Maksimov, A., Peters, M., Schulze, C., Müller, M., Conraths, F.J., Schares, G., 2010. Microsatellite typing and avidity analysis suggest a common source of infection in herds with epidemic *Neospora caninum*-associated bovine abortion. *Vet. Parasitol.* 173, 24–31.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.06.009>
- Basso, W., Venturini, L., Venturini, M.C., Hill, D.E., Kwok, O.C., Shen, S.K., Dubey, J.P., 2001a. First isolation of *Neospora caninum* from the feces of a naturally infected dog. *J. Parasitol.* 87, 612–618. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2001\)087\[0612:FIONCF\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2001)087[0612:FIONCF]2.0.CO;2)
- Basso, W., Venturini, L., Venturini, M.C., Moore, P., Rambeau, M., Unzaga, J.M., Campero, C., Bacigalupe, D., Dubey, J.P., 2001b. Prevalence of *Neospora caninum* Infection in Dogs From Beef-Cattle Farms, Dairy Farms, and From Urban Areas of Argentina. *J. Parasitol.* 87, 906–907. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2001\)087\[0906:PONCII\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2001)087[0906:PONCII]2.0.CO;2)
- Baszler, T.V., Adams, S., Vander-Schalie, J., Mathison, B.A., Kostovic, M., 2001. Validation of a commercially available monoclonal antibody-based competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for detection of serum antibodies to *Neospora caninum* in cattle. *J. Clin. Microbiol.* 39, 3851–3857. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.11.3851-3857.2001>
- Baszler, T.V., Gay, L.J.C., Long, M.T., Mathison, B.A., 1999. Detection by PCR of *Neospora caninum* in Fetal Tissues from Spontaneous Bovine Abortions. *J. Clin. Microbiol.* 37, 4059–4064.
- Baszler, T.V., Knowles, D.P., Dubey, J.P., Gay, J.M., Mathison, B.A., McElwain, T.F., 1996. Serological diagnosis of bovine neosporosis by *Neospora caninum* monoclonal antibody-based competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 34, 1423–1428. <https://doi.org/10.1128/jcm.34.6.1423-1428.1996>
- Bech-Sàbat, G., López-Gatius, F., Santolaria, P., García-Ispuerto, I., Pabón, M., Nogareda, C., Yániz, J.L., Almería, S., 2007. Progesterone supplementation during mid-gestation increases the risk of abortion in *Neospora*-infected dairy cows with high antibody titres. *Vet. Parasitol.* 145, 164–167. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.11.018>
- Benavides, J., Collantes-Fernández, E., Ferre, I., Pérez, V., Campero, C., Mota, R., Innes, E., Ortega-Mora, L.M., 2014. Experimental ruminant models for bovine neosporosis: what is known and what is needed. *Parasitology* 141, 1471–1488.  
<https://doi.org/10.1017/S0031182014000638>
- Benevides, S.E.A.A., 2005. Aspetos da epidemiologia da infeção do vírus da diarreia viral bovina, do vírus herpes bovino 1, do *Neospora caninum* e sua importância na eficiência reprodutiva em explorações leiteira da Ilha Terceira (Dissertação de Mestrado). Departamento de Ciências Agrárias da Universidade dos Açores, Angra do Heroísmo.

- Bergeron, N., Fecteau, G., Paré, J., Martineau, R., Villeneuve, A., 2000. Vertical and horizontal transmission of *Neospora caninum* in dairy herds in Québec. *Can. Vet. J. Rev. Veterinaire Can.* 41, 464–467.
- Bergeron, N., Fecteau, G., Villeneuve, A., Girard, C., Paré, J., 2001a. Failure of dogs to shed oocysts after being fed bovine fetuses naturally infected by *Neospora caninum*. *Vet. Parasitol.* 97, 145–152. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(01\)00396-x](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(01)00396-x)
- Bergeron, N., Girard, C., Paré, J., Fecteau, G., Robinson, J., Baillargeon, P., 2001b. Rare detection of *Neospora caninum* in placentas from seropositive dams giving birth to full-term calves. *J. Vet. Diagn. Investig. Off. Publ. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagn. Inc* 13, 173–175. <https://doi.org/10.1177/104063870101300216>
- Bjerkas, I., Jenkins, M.C., Dubey, J.P., 1994. Identification and characterization of *Neospora caninum* tachyzoite antigens useful for diagnosis of neosporosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1, 214–221.
- Bjerkås, I., Mohn, S.F., Presthus, J., 1984. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Z. Parasitenkd. Berl. Ger.* 70, 271–274. <https://doi.org/10.1007/BF00942230>
- Björkman, C., Alvarez-Garcia, G., Conraths, F.J., Mattsson, J.G., Ortega-Mora, L.M., Sager, H., Schares, G., 2006. *Neospora caninum* IgG avidity tests: an interlaboratory comparison. *Vet. Parasitol.* 140, 273–280. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.04.030>
- Björkman, C., Hemphill, A., 1998. Characterization of *Neospora caninum* iscom antigens using monoclonal antibodies. *Parasite Immunol.* 20, 73–80. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.1998.00127.x>
- Björkman, C., Holmdahl, O.J., Uggla, A., 1997. An indirect enzyme-linked immunoassay (ELISA) for demonstration of antibodies to *Neospora caninum* in serum and milk of cattle. *Vet. Parasitol.* 68, 251–260. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(96\)01076-x](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(96)01076-x)
- Björkman, C., Johansson, O., Stenlund, S., Holmdahl, O.J., Uggla, A., 1996. *Neospora* species infection in a herd of dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 208, 1441–1444.
- Björkman, C., McAllister, M.M., Frössling, J., Näslund, K., Leung, F., Uggla, A., 2003. Application of the *Neospora caninum* IgG avidity ELISA in assessment of chronic reproductive losses after an outbreak of neosporosis in a herd of beef cattle. *J. Vet. Diagn. Investig. Off. Publ. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagn. Inc* 15, 3–7. <https://doi.org/10.1177/104063870301500102>
- Björkman, C., Näslund, K., Stenlund, S., Maley, S.W., Buxton, D., Uggla, A., 1999. An IgG avidity ELISA to discriminate between recent and chronic *Neospora caninum* infection. *J. Vet. Diagn. Investig. Off. Publ. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagn. Inc* 11, 41–44. <https://doi.org/10.1177/104063879901100106>
- Björkman, C., Uggla, A., 1999. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. *Int. J. Parasitol.* 29, 1497–1507. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(99\)00115-0](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(99)00115-0)
- Blumröder, D. von, Stambusch, R., Labohm, R., Klawonn, W., Dräger, K., Fasen, W., Conraths, F.J., Schares, G., 2006. Potenzielle Risikofaktoren für den serologischen Nachweis von *Neospora-caninum*-Infektionen in Rinderherden in Rheinland-Pfalz. *Tierärztl. Prax. Ausg. G Großtiere Nutztiere* 34, 141–147. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1621064>
- Boger, L.A., Hattel, A.L., 2003. Additional evaluation of undiagnosed bovine abortion cases may reveal fetal neosporosis. *Vet. Parasitol.* 113, 1–6. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(03\)00041-4](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(03)00041-4)
- Boulton, J.G., Gill, P.A., Cook, R.W., Fraser, G.C., Harper, P. a. W., Dubey, J.P., 1995. Bovine *Neospora* abortion in north-eastern New South Wales. *Aust. Vet. J.* 72, 119–120.
- Bowie, W.R., King, A.S., Werker, D.H., Isaac-Renton, J.L., Bell, A., Eng, S.B., Marion, S.A., 1997. Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. *The BC*



- Toxoplasma Investigation Team. *Lancet Lond. Engl.* 350, 173–177. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(96\)11105-3](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(96)11105-3)
- Buxton, D., Caldow, G.L., Maley, S.W., Marks, J., Innes, E.A., 1997. Neosporosis and bovine abortion in Scotland. *Vet. Rec.* 141, 649–651. <https://doi.org/10.1136/vr.141.25.649>
- Buxton, D., McAllister, M.M., Dubey, J.P., 2002. The comparative pathogenesis of neosporosis. *Trends Parasitol.* 18, 546–552. [https://doi.org/10.1016/s1471-4922\(02\)02414-5](https://doi.org/10.1016/s1471-4922(02)02414-5)
- Cabral, A.D., Camargo, C.N., Galleti, N.T.C., Okuda, L.H., Pituco, E.M., Del Fava, C., 2009. Diagnosis of *Neospora caninum* in bovine fetuses by histology, immunohistochemistry, and nested-PCR. *Rev. Bras. Parasitol. Veterinária* 18, 14–19.
- Caetano-da-Silva, A., Ferre, I., Collantes-Fernández, E., Navarro, V., Aduriz, G., Ugarte-Garagalza, C., Ortega-Mora, L.M., 2004. Occasional detection of *Neospora caninum* DNA in frozen extended semen from naturally infected bulls. *Theriogenology* 62, 1329–1336. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.01.010>
- Campero, L.M., Minke, L., Moré, G., Rambeaud, M., Bacigalupe, D., Moore, D.P., Hecker, Y., Campero, C.M., Schares, G., Venturini, M.C., 2015. Evaluation and comparison of serological methods for the detection of bovine neosporosis in Argentina. *Rev. Argent. Microbiol.* 47, 295–301. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2015.07.002>
- Campero, L.M., Moreno-Gonzalo, J., Venturini, M.C., Moré, G., Dellarupe, A., Rambeaud, M., Echaide, I.E., Valentini, B., Campero, C.M., Moore, D.P., Cano, D.B., Fort, M., Mota, R.A., Serrano-Martínez, M.E., Cruz-Vázquez, C., Ortega-Mora, L.M., Álvarez-García, G., 2018. An Ibero-American inter-laboratory trial to evaluate serological tests for the detection of anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle. *Trop. Anim. Health Prod.* 50, 75–84. <https://doi.org/10.1007/s11250-017-1401-x>
- Canada, N., Carvalheira, J., Meireles, C.S., Correia da Costa, J.M., Rocha, A., 2004. Prevalence of *Neospora caninum* infection in dairy cows and its consequences for reproductive management. *Theriogenology* 62, 1229–1235. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.01.004>
- Canada, N., Meireles, C.S., Ferreira, P., Correia da Costa, J.M., Rocha, A., 2006. Artificial insemination of cows with semen in vitro contaminated with *Neospora caninum* tachyzoites failed to induce neosporosis. *Vet. Parasitol.* 139, 109–114. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.02.014>
- Canada, N., Meireles, C.S., Rocha, A., da Costa, J.M.C., Erickson, M.W., Dubey, J.P., 2002a. Isolation of viable *Toxoplasma gondii* from naturally infected aborted bovine fetuses. *J. Parasitol.* 88, 1247–1248. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2002\)088\[1247:IOVTGF\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2002)088[1247:IOVTGF]2.0.CO;2)
- Canada, N., Meireles, C.S., Rocha, A., Sousa, S., Thompson, G., Dubey, J.P., Romand, S., Thulliez, P., Correia da Costa, J.M., 2002b. First Portuguese isolate of *Neospora caninum* from an aborted fetus from a dairy herd with endemic neosporosis. *Vet. Parasitol.* 110, 11–15. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(02\)00333-3](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(02)00333-3)
- Capelli, G., Nardelli, S., di Regalbano, A.F., Scala, A., Pietrobelli, M., 2004. Sero-epidemiological survey of *Neospora caninum* infection in dogs in north-eastern Italy. *Vet. Parasitol.* 123, 143–148. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.06.012>
- Capelli, G., Natale, A., Nardelli, S., Frangipane di Regalbano, A., Pietrobelli, M., 2006. Validation of a commercially available cELISA test for canine neosporosis against an indirect fluorescent antibody test (IFAT). *Prev. Vet. Med.* 73, 315–320. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2005.10.001>
- Carvalho, J.V., Alves, C.M.O.S., Cardoso, M.R.D., Mota, C.M., Barbosa, B.F., Ferro, E.A.V., Silva, N.M., Mineo, T.W.P., Mineo, J.R., Silva, D.A.O., 2010. Differential susceptibility of human trophoblastic (BeWo) and uterine cervical (HeLa) cells to *Neospora caninum* infection. *Int. J. Parasitol.* 40, 1629–1637. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.06.010>

- Caspe, S.G., Moore, D.P., Leunda, M.R., Cano, D.B., Lischinsky, L., Regidor-Cerrillo, J., Álvarez-García, G., Echaide, I.G., Bacigalupe, D., Ortega Mora, L.M., Odeón, A.C., Campero, C.M., 2012. The *Neospora caninum*-Spain 7 isolate induces placental damage, fetal death and abortion in cattle when inoculated in early gestation. *Vet. Parasitol.* 189, 171–181. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.04.034>
- Cavalcante, G.T., Monteiro, R.M., Soares, R.M., Nishi, S.M., Alves Neto, A.F., Esmerini, P. de O., Sercundes, M.K., Martins, J., Gennari, S.M., 2011. Shedding of *Neospora caninum* oocysts by dogs fed different tissues from naturally infected cattle. *Vet. Parasitol.* 179, 220–223. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.02.026>
- Cedillo, C.J.R., Martínez, M.J.J., Santacruz, A.M., Banda, R.V.M., Morales, S.E., 2008. Models for experimental infection of dogs fed with tissue from fetuses and neonatal cattle naturally infected with *Neospora caninum*. *Vet. Parasitol.* 154, 151–155. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.02.025>
- Chanlun, A., Emanuelson, U., Chanlun, S., Aiumlamai, S., Björkman, C., 2006. Application of repeated bulk milk testing for identification of infection dynamics of *Neospora caninum* in Thai dairy herds. *Vet. Parasitol.* 136, 243–250. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.11.025>
- Chanlun, A., Näslund, K., Aiumlamai, S., Björkman, C., 2002. Use of bulk milk for detection of *Neospora caninum* infection in dairy herds in Thailand. *Vet. Parasitol.* 110, 35–44. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(02\)00315-1](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(02)00315-1)
- Cheadle, M.A., Lindsay, D.S., Blagburn, B.L., 1999a. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs. *Vet. Parasitol.* 85, 325–330. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(99\)00105-3](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(99)00105-3)
- Cheadle, M.A., Lindsay, D.S., Rowe, S., Dykstra, C.C., Williams, M.A., Spencer, J.A., Toivio-Kinnucan, M.A., Lenz, S.D., Newton, J.C., Rolsma, M.D., Blagburn, B.L., 1999b. Prevalence of antibodies to *Neospora* sp. in horses from Alabama and characterisation of an isolate recovered from a naturally infected horse [corrected]. *Int. J. Parasitol.* 29, 1537–1543. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(99\)00140-x](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(99)00140-x)
- Chi, J., VanLeeuwen, J.A., Weersink, A., Keefe, G.P., 2002. Direct production losses and treatment costs from bovine viral diarrhoea virus, bovine leukosis virus, *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis, and *Neospora caninum*. *Prev. Vet. Med.* 55, 137–153. [https://doi.org/10.1016/s0167-5877\(02\)00094-6](https://doi.org/10.1016/s0167-5877(02)00094-6)
- Ciuca, L., Borriello, G., Bosco, A., D'Andrea, L., Cringoli, G., Ciaramella, P., Maurelli, M.P., Di Loria, A., Rinaldi, L., Guccione, J., 2020. Seroprevalence and Clinical Outcomes of *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii* and *Besnoitia besnoiti* Infections in Water Buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Anim. Open Access J. MDPI* 10, E532. <https://doi.org/10.3390/ani10030532>
- CJM, B., H, H., G, V.S., W, W., TH, D., 2006. T5-5.4.2 - Estimated economic losses due to *N. caninum* infection in dairy cattle with and without a history of *Neospora caninum* associated abortion epidemics. *Int. Symp. Vet. Epidemiol. Econ. Proc. ISVEE 11: Proceedings of the 11th Symposium, Cairns, Australia*, 228.
- Cole, R.A., Lindsay, D.S., Blagburn, B.L., Sorjonen, D.C., Dubey, J.P., 1995. Vertical transmission of *Neospora caninum* in dogs. *J. Parasitol.* 81, 208–211.
- Cole, R.A., Lindsay, D.S., Dubey, J.P., Toivio-Kinnucan, M.A., Blagburn, B.L., 1994. Characterization of a murine monoclonal antibody generated against *Neospora caninum* tachyzoites by use of western blot analysis and immunoelectron microscopy. *Am. J. Vet. Res.* 55, 1717–1722.
- Collantes-Fernández, E., Arnáiz-Seco, I., Burgos, B.M., Rodríguez-Bertos, A., Aduriz, G., Fernández-García, A., Ortega-Mora, L.M., 2006. Comparison of *Neospora caninum* distribution, parasite loads and lesions between epidemic and endemic bovine

- abortion cases. *Vet. Parasitol.* 142, 187–191.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.05.030>
- Collantes-Fernández, E., Gómez-Bautista, M., Miró, G., Alvarez-García, G., Pereira-Bueno, J., Frisuelos, C., Ortega-Mora, L.M., 2008. Seroprevalence and risk factors associated with *Neospora caninum* infection in different dog populations in Spain. *Vet. Parasitol.* 152, 148–151. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.12.005>
- Conrad, P.A., Barr, B.C., Sverlow, K.W., Anderson, M., Daft, B., Kinde, H., Dubey, J.P., Munson, L., Ardans, A., 1993a. In vitro isolation and characterization of a *Neospora* sp. from aborted bovine fetuses. *Parasitology* 106 ( Pt 3), 239–249.  
<https://doi.org/10.1017/s0031182000075065>
- Conrad, P.A., Sverlow, K., Anderson, M., Rowe, J., BonDurant, R., Tuter, G., Breitmeyer, R., Palmer, C., Thurmond, M., Ardans, A., 1993b. Detection of serum antibody responses in cattle with natural or experimental *Neospora* infections. *J. Vet. Diagn. Investig. Off. Publ. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagn. Inc* 5, 572–578.  
<https://doi.org/10.1177/104063879300500412>
- Corbellini, L.G., Smith, D.R., Pescador, C.A., Schmitz, M., Correa, A., Steffen, D.J., Driemeier, D., 2006. Herd-level risk factors for *Neospora caninum* seroprevalence in dairy farms in southern Brazil. *Prev. Vet. Med.* 74, 130–141.  
<https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2005.11.004>
- Costa, K.S., Santos, S.L., Uzêda, R.S., Pinheiro, A.M., Almeida, M. a. O., Araújo, F.R., McAllister, M.M., Gondim, L.F.P., 2008. Chickens (*Gallus domesticus*) are natural intermediate hosts of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* 38, 157–159.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.10.008>
- Cruz, I., Vinhas, A.R., Dubey, J.P., Cardoso, L., Cotovio, M., Lopes, A.P., 2019. First report of antibodies to *Neospora* spp. in horses from Portugal. *Rev. Bras. Parasitol. Vet. Braz. J. Vet. Parasitol. Orgao Of. Col. Bras. Parasitol. Vet.* 28, 161–163.  
<https://doi.org/10.1590/S1984-2961201800081>
- Cummings, J.F., de Lahunta, A., Suter, M.M., Jacobson, R.H., 1988. Canine protozoan polyradiculoneuritis. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 76, 46–54.  
<https://doi.org/10.1007/BF00687679>
- Cuteri, V., Nisoli, L., Preziuso, S., Attili, A., Guerra, C., Lulla, D., Traldi, G., 2005. Application of a new therapeutic protocol against *Neospora caninum*-induced abortion in cattle: a field study. *J. Anim. Vet. Adv.* 4, 510–514.
- Daft, B.M., Barr, B.C., Collins, N., Sverlow, K., 1997. *Neospora* encephalomyelitis and polyradiculoneuritis in an aged mare with Cushing's disease. *Equine Vet. J.* 29, 240–243. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1997.tb01678.x>
- Darius, A.K., Mehlhorn, H., Heydorn, A.O., 2004. Effects of toltrazuril and ponazuril on the fine structure and multiplication of tachyzoites of the NC-1 strain of *Neospora caninum* (a synonym of *Hammondia heydorni*) in cell cultures. *Parasitol. Res.* 92, 453–458.  
<https://doi.org/10.1007/s00436-003-1063-7>
- Davis, S.W., Dubey, J.P., 1995. Mediation of immunity to *Toxoplasma gondii* oocyst shedding in cats. *J. Parasitol.* 81, 882–886.
- Davison, H.C., French, N.P., Trees, A.J., 1999a. Herd-specific and age-specific seroprevalence of *Neospora caninum* in 14 British dairy herds. *Vet. Rec.* 144, 547–550.  
<https://doi.org/10.1136/vr.144.20.547>
- Davison, H.C., Guy, C.S., McGarry, J.W., Guy, F., Williams, D.J., Kelly, D.F., Trees, A.J., 2001. Experimental studies on the transmission of *Neospora caninum* between cattle. *Res. Vet. Sci.* 70, 163–168. <https://doi.org/10.1053/rvsc.2001.0457>

- Davison, H.C., Otter, A., Trees, A.J., 1999b. Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle. *Int. J. Parasitol.* 29, 1683–1689. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(99\)00129-0](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(99)00129-0)
- de Barros, L.D., Garcia, J.L., Bresciani, K.D.S., Cardim, S.T., Storte, V.S., Headley, S.A., 2020. A Review of Toxoplasmosis and Neosporosis in Water Buffalo (*Bubalus bubalis*). *Front. Vet. Sci.* 7, 455. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00455>
- de Barros, L.D., Miura, A.C., Minutti, A.F., Vidotto, O., Garcia, J.L., 2018. *Neospora caninum* in birds: A review. *Parasitol. Int.* 67, 397–402. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2018.03.009>
- De Marez, T., Liddell, S., Dubey, J.P., Jenkins, M.C., Gasbarre, L., 1999. Oral infection of calves with *Neospora caninum* oocysts from dogs: humoral and cellular immune responses. *Int. J. Parasitol.* 29, 1647–1657. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(99\)00154-x](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(99)00154-x)
- De Meerschman, F., Focant, C., Detry, J., Rettigner, C., Cassart, D., Losson, B., 2005. Clinical, pathological and diagnostic aspects of congenital neosporosis in a series of naturally infected calves. *Vet. Rec.* 157, 115–118. <https://doi.org/10.1136/vr.157.4.115>
- De Meerschman, F., Speybroeck, N., Berkvens, D., Rettignera, C., Focant, C., Leclipteux, T., Cassart, D., Losson, B., 2002. Fetal infection with *Neospora caninum* in dairy and beef cattle in Belgium. *Theriogenology* 58, 933–945. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(02\)00934-2](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(02)00934-2)
- de Moura, L., Bahia-Oliveira, L.M.G., Wada, M.Y., Jones, J.L., Tuboi, S.H., Carmo, E.H., Ramalho, W.M., Camargo, N.J., Trevisan, R., Graça, R.M.T., da Silva, A.J., Moura, I., Dubey, J.P., Garrett, D.O., 2006. Waterborne toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 326–329. <https://doi.org/10.3201/eid1202.041115>
- de Oliveira Junior, I.M., Mesquita, L.E.D.S., Miranda, D.N.P., Gomes, T.A., Vasconcelos, B.K.S., Penha, L.C., Silveira, L.C.S., Redondo, A.R.R., Costa, R.C., Bruhn, F.R.P., Raymundo, D.L., Wouters, A.T.B., Wouters, F., Varaschin, M.S., 2020. Endogenous transplacental transmission of *Neospora caninum* in successive generations of congenitally infected goats. *Vet. Parasitol.* 284, 109191. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109191>
- de Oliveira, V.S.F., Alvarez-Garcia, G., Ortega-Mora, L.M., Borges, L.M.F., da Silva, A.C., 2010. Abortions in bovines and *Neospora caninum* transmission in an embryo transfer center. *Vet. Parasitol.* 173, 206–210. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.06.028>
- de Souza, S.L.P., Guimarães, J.S., Ferreira, F., Dubey, J.P., Gennari, S.M., 2002. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies in dogs from dairy cattle farms in Parana, Brazil. *J. Parasitol.* 88, 408–409. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2002\)088\[0408:PONCAI\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2002)088[0408:PONCAI]2.0.CO;2)
- De Vries, A., 2006. Economic value of pregnancy in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 89, 3876–3885. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72430-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72430-4)
- Debache, K., Guionaud, C., Kropf, C., Boykin, D., Stephens, C.E., Hemphill, A., 2011. Experimental treatment of *Neospora caninum*-infected mice with the arylimidamide DB750 and the thiazolide nitazoxanide. *Exp. Parasitol.* 129, 95–100. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2011.07.010>
- Demir, P.A., Eşki, F., Ütük, A.E., 2020. Estimating the total economic costs of *Neospora caninum* infections in dairy cows in Turkey. *Trop. Anim. Health Prod.* 52, 3251–3258. <https://doi.org/10.1007/s11250-020-02351-1>
- Dempster, R.P., 1984. *Toxoplasma gondii*: purification of zoites from peritoneal exudates by eight methods. *Exp. Parasitol.* 57, 195–207. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(84\)90080-8](https://doi.org/10.1016/0014-4894(84)90080-8)
- Dijkstra, T., Barkema, H.W., Björkman, C., Wouda, W., 2002. A high rate of seroconversion for *Neospora caninum* in a dairy herd without an obvious increased incidence of

- abortions. *Vet. Parasitol.* 109, 203–211. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(02\)00303-5](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(02)00303-5)
- Dijkstra, T., Barkema, H.W., Eysker, M., Beiboer, M.L., Wouda, W., 2003. Evaluation of a single serological screening of dairy herds for *Neospora caninum* antibodies. *Vet. Parasitol.* 110, 161–169. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(02\)00323-0](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(02)00323-0)
- Dijkstra, Th, Barkema, H.W., Eysker, M., Hesselink, J.W., Wouda, W., 2002a. Natural transmission routes of *Neospora caninum* between farm dogs and cattle. *Vet. Parasitol.* 105, 99–104. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(02\)00010-9](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(02)00010-9)
- Dijkstra, T., Barkema, H.W., Eysker, M., Wouda, W., 2001a. Evidence of post-natal transmission of *Neospora caninum* in Dutch dairy herds. *Int. J. Parasitol.* 31, 209–215. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(00\)00160-0](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(00)00160-0)
- Dijkstra, Th, Barkema, H.W., Hesselink, J.W., Wouda, W., 2002b. Point source exposure of cattle to *Neospora caninum* consistent with periods of common housing and feeding and related to the introduction of a dog. *Vet. Parasitol.* 105, 89–98. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(02\)00009-2](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(02)00009-2)
- Dijkstra, T., Eysker, M., Schares, G., Conraths, F.J., Wouda, W., Barkema, H.W., 2001b. Dogs shed *Neospora caninum* oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrum spiked with *Neospora caninum* tachyzoites. *Int. J. Parasitol.* 31, 747–752. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(01\)00230-2](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(01)00230-2)
- Donahoe, S.L., Lindsay, S.A., Krockenberger, M., Phalen, D., Šlapeta, J., 2015. A review of neosporosis and pathologic findings of *Neospora caninum* infection in wildlife. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* 4, 216–238. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2015.04.002>
- DRAAC, 2021. Agricultura e Recursos Florestais - Relatório do Estado do Ambiente dos Açores - Direção Regional do Ambiente e Alterações Climáticas (Estatístico). DRAAC.
- Du, L., Yang, D., Zhai, T., Gong, P., Zhang, X., Li, J., 2015. Detection of *Neospora caninum*-DNA in brain tissues from pigeons in Changchun, Jilin (China). *Vet. Parasitol.* 214, 171–173. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.09.005>
- Duarte, P.O., Oshiro, L.M., Zimmermann, N.P., Csordas, B.G., Dourado, D.M., Barros, J.C., Andreotti, R., 2020. Serological and molecular detection of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in human umbilical cord blood and placental tissue samples. *Sci. Rep.* 10, 9043. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65991-1>
- Dubey, J.P., 2004a. Toxoplasmosis - a waterborne zoonosis. *Vet. Parasitol.* 126, 57–72. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.09.005>
- Dubey, J.P., 2004b. Toxoplasmosis - a waterborne zoonosis. *Vet. Parasitol.* 126, 57–72. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.09.005>
- Dubey, J.P., 2003. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *Korean J. Parasitol.* 41, 1–16. <https://doi.org/10.3347/kjp.2003.41.1.1>
- Dubey, J.P., 1999. Recent advances in *Neospora* and neosporosis. *Vet. Parasitol.* 84, 349–367. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(99\)00044-8](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(99)00044-8)
- Dubey, J.P., Abbitt, B., Topper, M.J., Edwards, J.F., 1998. Hydrocephalus associated with *Neospora caninum* infection in an aborted bovine fetus. *J. Comp. Pathol.* 118, 169–173. [https://doi.org/10.1016/s0021-9975\(98\)80010-8](https://doi.org/10.1016/s0021-9975(98)80010-8)
- Dubey, J.P., Acland, H.M., Hamir, A.N., 1992a. *Neospora caninum* (Apicomplexa) in a stillborn goat. *J. Parasitol.* 78, 532–534.
- Dubey, J.P., Barr, B.C., Barta, J.R., Bjerkås, I., Björkman, C., Blagburn, B.L., Bowman, D.D., Buxton, D., Ellis, J.T., Gottstein, B., Hemphill, A., Hill, D.E., Howe, D.K., Jenkins, M.C., Kobayashi, Y., Koudela, B., Marsh, A.E., Mattsson, J.G., McAllister, M.M., Modrý, D., Omata, Y., Sibley, L.D., Speer, C.A., Trees, A.J., Uggla, A., Upton, S.J., Williams, D.J.L., Lindsay, D.S., 2002a. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from

- related coccidia. *Int. J. Parasitol.* 32, 929–946. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(02\)00094-2](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(02)00094-2)
- Dubey, J.P., Buxton, D., Wouda, W., 2006. Pathogenesis of bovine neosporosis. *J. Comp. Pathol.* 134, 267–289. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2005.11.004>
- Dubey, J.P., Carpenter, J.L., Speer, C.A., Topper, M.J., Uggla, A., 1988a. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 192, 1269–1285.
- Dubey, J.P., Garner, M.M., Stetter, M.D., Marsh, A.E., Barr, B.C., 2001a. Acute *Sarcocystis falcatula*-like infection in a carmine bee-eater (*Merops nubicus*) and immunohistochemical cross reactivity between *Sarcocystis falcatula* and *Sarcocystis neurona*. *J. Parasitol.* 87, 824–832. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2001\)087\[0824:ASFLII\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2001)087[0824:ASFLII]2.0.CO;2)
- Dubey, J.P., Hartley, W.J., Lindsay, D.S., Topper, M.J., 1990. Fatal congenital *Neospora caninum* infection in a lamb. *J. Parasitol.* 76, 127–130.
- Dubey, J.P., Hattel, A.L., Lindsay, D.S., Topper, M.J., 1988b. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 193, 1259–1263.
- Dubey, J.P., Hemphill, A., Calero-Bernal, R., Schares, G., 2017. *Neosporosis in Animals*. CRC Press, Boca Raton. <https://doi.org/10.1201/9781315152561>
- Dubey, J.P., Janovitz, E.B., Skowronek, A.J., 1992b. Clinical neosporosis in a 4-week-old Hereford calf. *Vet. Parasitol.* 43, 137–141. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(92\)90056-f](https://doi.org/10.1016/0304-4017(92)90056-f)
- Dubey, J.P., Jenkins, M.C., Rajendran, C., Miska, K., Ferreira, L.R., Martins, J., Kwok, O.C.H., Choudhary, S., 2011. Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for *Neospora caninum*. *Vet. Parasitol.* 181, 382–387. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.018>
- Dubey, J.P., Knickman, E., Greene, C., 2005. Neonatal *Neospora caninum* infections in dogs. *Acta Parasitol.* 50, 176–179.
- Dubey, J.P., Leathers, C.W., Lindsay, D.S., 1989. *Neospora caninum*-like protozoon associated with fatal myelitis in newborn calves. *J. Parasitol.* 75, 146–148.
- Dubey, J.P., Liddell, S., Mattson, D., Speert, C.A., Howe, D.K., Jenkins, M.C., 2001b. Characterization of the Oregon isolate of *Neospora hughesi* from a horse. *J. Parasitol.* 87, 345–353. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2001\)087\[0345:COTOIO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2001)087[0345:COTOIO]2.0.CO;2)
- Dubey, J.P., Lindsay, D.S., 2000. Gerbils (*Meriones unguiculatus*) are highly susceptible to oral infection with *Neospora caninum* oocysts. *Parasitol. Res.* 86, 165–168. <https://doi.org/10.1007/s004360050027>
- Dubey, J.P., Lindsay, D.S., 1996. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Vet. Parasitol.* 67, 1–59. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(96\)01035-7](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(96)01035-7)
- Dubey, J.P., Lindsay, D.S., 1993. Neosporosis. *Parasitol. Today Pers. Ed* 9, 452–458. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(93\)90099-2](https://doi.org/10.1016/0169-4758(93)90099-2)
- Dubey, J.P., Lindsay, D.S., 1990. *Neospora caninum* induced abortion in sheep. *J. Vet. Diagn. Investig. Off. Publ. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagn. Inc* 2, 230–233. <https://doi.org/10.1177/104063879000200316>
- Dubey, J.P., Lindsay, D.S., 1989a. Transplacental *Neospora caninum* infection in cats. *J. Parasitol.* 75, 765–771.
- Dubey, J.P., Lindsay, D.S., 1989b. Fatal *Neospora caninum* infection in kittens. *J. Parasitol.* 75, 148–151.
- Dubey, J.P., Lindsay, D.S., 1989c. Transplacental *Neospora caninum* infection in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 50, 1578–1579.
- Dubey, J.P., Lindsay, D.S., Adams, D.S., Gay, J.M., Baszler, T.V., Blagburn, B.L., Thulliez, P., 1996a. Serologic responses of cattle and other animals infected with *Neospora caninum*. *Am. J. Vet. Res.* 57, 329–336.

- Dubey, J.P., Lindsay, D.S., Hill, D., Romand, S., Thulliez, P., Kwok, O.C.H., Silva, J.C.R., Oliveira-Camargo, M.C., Gennari, S.M., 2002b. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Sarcocystis neurona* in sera of domestic cats from Brazil. *J. Parasitol.* 88, 1251–1252. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2002\)088\[1251:POATNC\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2002)088[1251:POATNC]2.0.CO;2)
- Dubey, J.P., Morales, J.A., Villalobos, P., Lindsay, D.S., Blagburn, B.L., Topper, M.J., 1996b. Neosporosis-associated abortion in a dairy goat. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 208, 263–265.
- Dubey, J.P., Porterfield, M.L., 1990. *Neospora caninum* (Apicomplexa) in an aborted equine fetus. *J. Parasitol.* 76, 732–734.
- Dubey, J.P., Schares, G., 2011. Neosporosis in animals—The last five years. *Vet. Parasitol., Special Issue: Towards good management practises in parasite control* 180, 90–108. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.031>
- Dubey, J.P., Schares, G., 2006. Diagnosis of bovine neosporosis. *Vet. Parasitol.* 140, 1–34. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.03.035>
- Dubey, J.P., Schares, G., Ortega-Mora, L.M., 2007. Epidemiology and Control of Neosporosis and *Neospora caninum*. *Clin. Microbiol. Rev.* 20, 323–367. <https://doi.org/10.1128/CMR.00031-06>
- Dubey, J.P., Sreekumar, C., Knickman, E., Miska, K.B., Vianna, M.C.B., Kwok, O.C.H., Hill, D.E., Jenkins, M.C., Lindsay, D.S., Greene, C.E., 2004. Biologic, morphologic, and molecular characterisation of *Neospora caninum* isolates from littermate dogs. *Int. J. Parasitol.* 34, 1157–1167. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.07.005>
- Dubey, J.P., Thulliez, P., 2005. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in wild animals. *J. Parasitol.* 91, 1217–1218. <https://doi.org/10.1645/GE-576R.1>
- Dubey, J.P., Zarnke, R., Thomas, N.J., Wong, S.K., Bonn, W.V., Briggs, M., Davis, J.W., Ewing, R., Mense, M., Kwok, O.C.H., Romand, S., Thulliez, P., 2003. *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Sarcocystis neurona*, and *Sarcocystis canis*-like infections in marine mammals. *Vet. Parasitol.* 116, 275–296. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(03\)00263-2](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(03)00263-2)
- Dyer, R.M., Jenkins, M.C., Kwok, O.C., Douglas, L.W., Dubey, J.P., 2000. Serologic survey of *Neospora caninum* infection in a closed dairy cattle herd in Maryland: risk of serologic reactivity by production groups. *Vet. Parasitol.* 90, 171–181. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(00\)00253-3](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(00)00253-3)
- Ellis, J., Luton, K., Baverstock, P.R., Brindley, P.J., Nimmo, K.A., Johnson, A.M., 1994. The phylogeny of *Neospora caninum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 64, 303–311. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(94\)00033-6](https://doi.org/10.1016/0166-6851(94)00033-6)
- Esposito, M., Moores, S., Naguleswaran, A., Müller, J., Hemphill, A., 2007. Induction of tachyzoite egress from cells infected with the protozoan *Neospora caninum* by nitro- and bromo-thiazolides, a class of broad-spectrum anti-parasitic drugs. *Int. J. Parasitol.* 37, 1143–1152. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.03.007>
- Fernandes, B.C.T.M., Gennari, S.M., Souza, S.L.P., Carvalho, J.M., Oliveira, W.G., Cury, M.C., 2004. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in dogs from urban, periurban and rural areas of the city of Uberlândia, Minas Gerais--Brazil. *Vet. Parasitol.* 123, 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.05.016>
- Ferre, I., Aduriz, G., Del-Pozo, I., Regidor-Cerrillo, J., Atxaerandio, R., Collantes-Fernández, E., Hurtado, A., Ugarte-Garagalza, C., Ortega-Mora, L.M., 2005. Detection of *Neospora caninum* in the semen and blood of naturally infected bulls. *Theriogenology* 63, 1504–1518. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.07.002>
- Ferro, A.B., 2014. *Imunohistoquímica*. Amadeu Borges Ferro.
- Fioretti, D.P., Rosignoli, L., Ricci, G., Moretti, A., Pasquali, P., Polidori, G.A., 2000. *Neospora caninum* Infection in a Clinically Healthy Calf: Parasitological Study and Serological

- Follow-up. *J. Vet. Med. Ser. B* 47, 47–53. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0450.2000.00304.x>
- Fischer, I., Furrer, K., Audigé, L., Fritsche, A., Giger, T., Gottstein, B., Sager, H., 2003. [The importance of bovine neosporosis for abortion in Switzerland]. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 145, 114–123. <https://doi.org/10.1024/0036-7281.145.3.114>
- French, N.P., Clancy, D., Davison, H.C., Trees, A.J., 1999. Mathematical models of *Neospora caninum* infection in dairy cattle: transmission and options for control. *Int. J. Parasitol.* 29, 1691–1704. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(99\)00131-9](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(99)00131-9)
- Frössling, J., Lindberg, A., Björkman, C., 2006. Evaluation of an iscom ELISA used for detection of antibodies to *Neospora caninum* in bulk milk. *Prev. Vet. Med.* 74, 120–129. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2005.11.012>
- Frössling, J., Uggla, A., Björkman, C., 2005. Prevalence and transmission of *Neospora caninum* within infected Swedish dairy herds. *Vet. Parasitol.* 128, 209–218. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.12.006>
- García-Ispierto, I., López-Gatius, F., Almería, S., Yániz, J., Santolaria, P., Serrano, B., Bech-Sabat, G., Nogareda, C., Sulon, J., de Sousa, N.M., Beckers, J.F., 2009. Factors affecting plasma prolactin concentrations throughout gestation in high producing dairy cows. *Domest. Anim. Endocrinol.* 36, 57–66. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2008.10.004>
- García-Ispierto, I., Nogareda, C., Yániz, J.L., Almería, S., Martínez-Bello, D., de Sousa, N.M., Beckers, J.F., López-Gatius, F., 2010. *Neospora caninum* and coxiella burnetii seropositivity are related to endocrine pattern changes during gestation in lactating dairy cows. *Theriogenology* 74, 212–220. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.02.004>
- García-Sánchez, M., Jiménez-Pelayo, L., Horcajo, P., Collantes-Fernández, E., Ortega-Mora, L.M., Regidor-Cerrillo, J., 2020. *Neospora caninum* infection induces an isolate virulence-dependent pro-inflammatory gene expression profile in bovine monocyte-derived macrophages. *Parasit. Vectors* 13, 374. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04239-3>
- García-Vázquez, Z., Cruz-Vázquez, C., Medina-Espinoza, L., García-Tapia, D., Chavarria-Martinez, B., 2002. Serological survey of *Neospora caninum* infection in dairy cattle herds in Aguascalientes, Mexico. *Vet. Parasitol.* 106, 115–120. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(02\)00040-7](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(02)00040-7)
- García-Vázquez, Z., Rosario-Cruz, R., Ramos-Aragón, A., Cruz-Vázquez, C., Mapes-Sánchez, G., 2005. *Neospora caninum* seropositivity and association with abortions in dairy cows in Mexico. *Vet. Parasitol.* 134, 61–65. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.07.007>
- GEE, 2016. Desafios e oportunidades para a Ilha Terceira. Estudo sobre o impacto da redução de efetivos na Base das Lajes (Temas Económicos No. 37). Ministério da Economia, Avenida da República, n.º 79 1069-218 Lisboa, Portugal.
- Ghalmi, F., China, B., Jenkins, M., Azzag, N., Losson, B., 2014. Comparison of different serological methods to detect antibodies specific to *Neospora caninum* in bovine and canine sera. *J. Vet. Diagn. Investig. Off. Publ. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagn. Inc* 26, 136–140. <https://doi.org/10.1177/1040638713515480>
- Ghanem, M.E., Suzuki, T., Akita, M., Nishibori, M., 2009. *Neospora caninum* and complex vertebral malformation as possible causes of bovine fetal mummification. *Can. Vet. J.* 50, 389–392.
- Gibney, E.H., Kipar, A., Rosbottom, A., Guy, C.S., Smith, R.F., Hetzel, U., Trees, A.J., Williams, D.J.L., 2008. The extent of parasite-associated necrosis in the placenta and foetal tissues of cattle following *Neospora caninum* infection in early and late gestation correlates with foetal death. *Int. J. Parasitol.* 38, 579–588. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.09.015>



- Gondim, L.F.P., 2006. *Neospora caninum* in wildlife. *Trends Parasitol.* 22, 247–252.  
<https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.03.008>
- Gondim, L.F.P., Gao, L., McAllister, M.M., 2002. Improved production of *Neospora caninum* oocysts, cyclical oral transmission between dogs and cattle, and in vitro isolation from oocysts. *J. Parasitol.* 88, 1159–1163. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2002\)088\[1159:IPONCO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2002)088[1159:IPONCO]2.0.CO;2)
- Gondim, L.F.P., McAllister, M.M., Anderson-Sprecher, R.C., Björkman, C., Lock, T.F., Firkins, L.D., Gao, L., Fischer, W.R., 2004a. Transplacental transmission and abortion in cows administered *Neospora caninum* oocysts. *J. Parasitol.* 90, 1394–1400.  
<https://doi.org/10.1645/GE-359R>
- Gondim, L.F.P., McAllister, M.M., Gao, L., 2005. Effects of host maturity and prior exposure history on the production of *Neospora caninum* oocysts by dogs. *Vet. Parasitol.* 134, 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.06.011>
- Gondim, L.F.P., McAllister, M.M., Mateus-Pinilla, N.E., Pitt, W.C., Mech, L.D., Nelson, M.E., 2004b. Transmission of *Neospora caninum* between wild and domestic animals. *J. Parasitol.* 90, 1361–1365. <https://doi.org/10.1645/GE-341R>
- Gondim, L.F.P., McAllister, M.M., Pitt, W.C., Zemlicka, D.E., 2004c. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* 34, 159–161.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.01.001>
- Gondim, L.F.P., Pinheiro, A.M., Santos, P.O.M., Jesus, E.E.V., Ribeiro, M.B., Fernandes, H.S., Almeida, M.A.O., Freire, S.M., Meyer, R., McAllister, M.M., 2001. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected dog, and production of encysted bradyzoites in gerbils. *Vet. Parasitol.* 101, 1–7. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00493-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00493-9)
- González, L., Buxton, D., Atxaerandio, R., Aduriz, G., Maley, S., Marco, J.C., Cuervo, L.A., 1999. Bovine abortion associated with *Neospora caninum* in northern Spain. *Vet. Rec.* 144, 145–150. <https://doi.org/10.1136/vr.144.6.145>
- González-Warleta, M., Castro-Hermida, J.A., Calvo, C., Pérez, V., Gutiérrez-Expósito, D., Regidor-Cerrillo, J., Ortega-Mora, L.M., Mezo, M., 2018. Endogenous transplacental transmission of *Neospora caninum* during successive pregnancies across three generations of naturally infected sheep. *Vet. Res.* 49, 106.  
<https://doi.org/10.1186/s13567-018-0601-3>
- Goodswen, S.J., Kennedy, P.J., Ellis, J.T., 2014. Discovering a vaccine against neosporosis using computers: is it feasible? *Trends Parasitol.* 30, 401–411.  
<https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.06.004>
- Goodswen, S.J., Kennedy, P.J., Ellis, J.T., 2013. A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: from the past to the present. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* 13, 133–150.  
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.08.012>
- Gottstein, B., Conraths, F., 2007. Aetiological diagnosis, in: Ortega-Mora, L.M. (Ed.), *Protozoal Abortion in Farm Ruminants: Guidelines for Diagnosis and Control*. CABI, Cambridge, pp. 42–121.
- Gottstein, B., Hentrich, B., Wyss, R., Thür, B., Bruckner, L., Müller, N., Kaufmann, H., Waldvogel, A., 1999. [Molecular and immunodiagnostic studies of bovine neosporosis in Switzerland]. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 141, 59–68.
- Gray, M.L., Harmon, B., Sales, L., Dubey, J., 1996. Visceral Neosporosis in a 10-Year-Old Horse. *J. Vet. Diagn. Investig. Off. Publ. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagn. Inc.*  
<https://doi.org/10.1177/104063879600800125>

- Gui, B.-Z., Lv, Q.-Y., Ge, M., Li, R.-C., Zhu, X.-Q., Liu, G.-H., 2020. First report of *Neospora caninum* infection in pigs in China. *Transbound. Emerg. Dis.* 67, 29–32. <https://doi.org/10.1111/tbed.13358>
- Guido, S., Katzer, F., Nanjiani, I., Milne, E., Innes, E.A., 2016. Serology-Based Diagnostics for the Control of Bovine Neosporosis. *Trends Parasitol.* 32, 131–143. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.11.014>
- Gutiérrez-Expósito, D., González-Warleta, M., Espinosa, J., Vallejo-García, R., Castro-Hermida, J.A., Calvo, C., Ferreras, M.C., Pérez, V., Benavides, J., Mezo, M., 2020. Maternal immune response in the placenta of sheep during recrudescence of natural congenital infection of *Neospora caninum*. *Vet. Parasitol.* 285, 109204. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109204>
- Guy, C.S., Williams DJL, null, Kelly, D.F., McGarry, J.W., Guy, F., Björkman, C., Smith, R.F., Trees, A.J., 2001. *Neospora caninum* in persistently infected, pregnant cows: spontaneous transplacental infection is associated with an acute increase in maternal antibody. *Vet. Rec.* 149, 443–449. <https://doi.org/10.1136/vr.149.15.443>
- Haddad, J.P.A., Dohoo, I.R., VanLeewen, J.A., 2005. A review of *Neospora caninum* in dairy and beef cattle—a Canadian perspective. *Can. Vet. J. Rev. Veterinaire Can.* 46, 230–243.
- Haerdi, C., Haessig, M., Sager, H., Greif, G., Staubli, D., Gottstein, B., 2006. Humoral immune reaction of newborn calves congenitally infected with *Neospora caninum* and experimentally treated with toltrazuril. *Parasitol. Res.* 99, 534–540. <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0199-7>
- Hall, C.A., Reichel, M.P., Ellis, J.T., 2005. *Neospora* abortions in dairy cattle: diagnosis, mode of transmission and control. *Vet. Parasitol.* 128, 231–241. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.12.012>
- Hamir, A.N., Tornquist, S.J., Gerros, T.C., Topper, M.J., Dubey, J.P., 1998. *Neospora caninum*-associated equine protozoal myeloencephalitis. *Vet. Parasitol.* 79, 269–274. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(98\)00178-2](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(98)00178-2)
- Hartley, W.J., Bridge, P.S., 1975. A case of suspected congenital *Toxoplasma* encephalomyelitis in a lamb associated with a spinal cord anomaly. *Br. Vet. J.* 131, 380–384. [https://doi.org/10.1016/s0007-1935\(17\)35233-8](https://doi.org/10.1016/s0007-1935(17)35233-8)
- Häsler, B., Stärk, K.D.C., Sager, H., Gottstein, B., Reist, M., 2006. Simulating the impact of four control strategies on the population dynamics of *Neospora caninum* infection in Swiss dairy cattle. *Prev. Vet. Med.* 77, 254–283. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2006.07.007>
- Hässig, M., Gottstein, B., 2002. Epidemiological investigations of abortions due to *Neospora caninum* on Swiss dairy farms. *Vet. Rec.* 150, 538–542. <https://doi.org/10.1136/vr.150.17.538>
- Heckerroth, A.R., Tenter, A.M., 2007. Immunoanalysis of three litters born to a Doberman bitch infected with *Neospora caninum*. *Parasitol. Res.* 100, 837–846. <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0328-3>
- Helman, R.G., Stair, E.L., Lehenbauer, T.W., Rodgers, S., Saliki, J.T., 1998. Neosporal abortion in Oklahoma cattle with emphasis on the distribution of brain lesions in aborted fetuses. *J. Vet. Diagn. Investig. Off. Publ. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagn. Inc* 10, 292–295. <https://doi.org/10.1177/104063879801000314>
- Hemphill, A., Aguado-Martínez, A., Müller, J., 2016. Approaches for the vaccination and treatment of *Neospora caninum* infections in mice and ruminant models. *Parasitology* 143, 245–259. <https://doi.org/10.1017/S0031182015001596>
- Hemphill, A., Fuchs, N., Sonda, S., Hehl, A., 1999. The antigenic composition of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* 29, 1175–1188. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(99\)00085-5](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(99)00085-5)

- Hemphill, A., Gottstein, B., 2000. A European perspective on *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* 30, 877–924. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(00\)00072-2](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(00)00072-2)
- Hemphill, A., Vonlaufen, N., Golaz, J.L., Burgener, I.A., 2009. Infection of primary canine duodenal epithelial cell cultures with *Neospora caninum*. *J. Parasitol.* 95, 372–380. <https://doi.org/10.1645/GE-1812.1>
- Hemphill, A., Vonlaufen, N., Naguleswaran, A., 2006. Cellular and immunological basis of the host-parasite relationship during infection with *Neospora caninum*. *Parasitology* 133, 261–278. <https://doi.org/10.1017/S0031182006000485>
- Hernandez, J., Risco, C., Donovan, A., 2002. Risk of abortion associated with *Neospora caninum* during different lactations and evidence of congenital transmission in dairy cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 221, 1742–1746. <https://doi.org/10.2460/javma.2002.221.1741>
- Hernandez, J., Risco, C., Donovan, A., 2001. Association between exposure to *Neospora caninum* and milk production in dairy cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 219, 632–635. <https://doi.org/10.2460/javma.2001.219.632>
- Hobson, J.C., Duffield, T.F., Kelton, D., Lissemore, K., Hietala, S.K., Leslie, K.E., McEwen, B., Cramer, G., Peregrine, A.S., 2002. *Neospora caninum* serostatus and milk production of Holstein cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 221, 1160–1164. <https://doi.org/10.2460/javma.2002.221.1160>
- Hobson, J.C., Duffield, T.F., Kelton, D., Lissemore, K., Hietala, S.K., Leslie, K.E., McEwen, B., Peregrine, A.S., 2005. Risk factors associated with *Neospora caninum* abortion in Ontario Holstein dairy herds. *Vet. Parasitol.* 127, 177–188. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.09.025>
- Holmdahl, O.J., Mattsson, J.G., 1996. Rapid and sensitive identification of *Neospora caninum* by in vitro amplification of the internal transcribed spacer 1. *Parasitology* 112 ( Pt 2), 177–182. <https://doi.org/10.1017/s0031182000084742>
- Howe, L., Collett, M.G., Pattison, R.S., Marshall, J., West, D.M., Pomroy, W.E., 2012. Potential involvement of *Neospora caninum* in naturally occurring ovine abortions in New Zealand. *Vet. Parasitol.* 185, 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.10.033>
- Huang, C.-C., Yang, C.-H., Watanabe, Y., Liao, Y.-K., Ooi, H.-K., 2004. Finding of *Neospora caninum* in the wild brown rat (*Rattus norvegicus*). *Vet. Res.* 35, 283–290. <https://doi.org/10.1051/vetres:2004010>
- Hughes, J.M., Williams, R.H., Morley, E.K., Cook, D. a. N., Terry, R.S., Murphy, R.G., Smith, J.E., Hide, G., 2006. The prevalence of *Neospora caninum* and co-infection with *Toxoplasma gondii* by PCR analysis in naturally occurring mammal populations. *Parasitology* 132, 29–36. <https://doi.org/10.1017/S0031182005008784>
- IFAP, 2021. Setor de Leite - IFAP (Relatório Estatístico).
- INE, 2021. Efetivo bovino nacional (N.º) - 1.º Semestre de 2021 (Relatório Estatístico). INE, Lisboa.
- Innes, E.A., 2007. The host-parasite relationship in pregnant cattle infected with *Neospora caninum*. *Parasitology* 134, 1903–1910. <https://doi.org/10.1017/S0031182007000194>
- Innes, E.A., Andrianarivo, A.G., Björkman, C., Williams, D.J.L., Conrad, P.A., 2002. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. *Trends Parasitol.* 18, 497–504. [https://doi.org/10.1016/s1471-4922\(02\)02372-3](https://doi.org/10.1016/s1471-4922(02)02372-3)
- Innes, E.A., Wright, S.E., Maley, S., Rae, A., Schock, A., Kirvar, E., Bartley, P., Hamilton, C., Carey, I.M., Buxton, D., 2001. Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. *Int. J. Parasitol.* 31, 1523–1534. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(01\)00284-3](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(01)00284-3)
- Jenkins, M., Baszler, T., Björkman, C., Schares, G., Williams, D., 2002. Diagnosis and seroepidemiology of *Neospora caninum*-associated bovine abortion. *Int. J. Parasitol.* 32, 631–636. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(01\)00363-0](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(01)00363-0)

- Jenkins, M.C., Caver, J.A., Bjorkman, C., Anderson, T.C., Romand, S., Vinyard, B., Uggla, A., Thulliez, P., Dubey, J.P., 2000. Serological investigation of an outbreak of *Neospora caninum*-associated abortion in a dairy herd in southeastern United States.
- Jenkins, M.C., Parker, C., Hill, D., Pinckney, R.D., Dyer, R., Dubey, J.P., 2007. *Neospora caninum* detected in feral rodents. *Vet. Parasitol.* 143, 161–165.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.08.011>
- Jensen, A.M., Björkman, C., Kjeldsen, A.M., Wedderkopp, A., Willadsen, C., Uggla, A., Lind, P., 1999. Associations of *Neospora caninum* seropositivity with gestation number and pregnancy outcome in Danish dairy herds. *Prev. Vet. Med.* 40, 151–163.  
[https://doi.org/10.1016/s0167-5877\(99\)00048-3](https://doi.org/10.1016/s0167-5877(99)00048-3)
- Jiménez-Pelayo, L., García-Sánchez, M., Vázquez, P., Regidor-Cerrillo, J., Horcajo, P., Collantes-Fernández, E., Blanco-Murcia, J., Gutiérrez-Expósito, D., Román-Trufero, A., Osoro, K., Benavides, J., Ortega-Mora, L.M., 2019. Early *Neospora caninum* infection dynamics in cattle after inoculation at mid-gestation with high (Nc-Spain7)- or low (Nc-Spain1H)-virulence isolates. *Vet. Res.* 50, 72. <https://doi.org/10.1186/s13567-019-0691-6>
- Jones, J.L., Dubey, J.P., 2010. Waterborne toxoplasmosis--recent developments. *Exp. Parasitol.* 124, 10–25. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.03.013>
- Kashiwazaki, Y., Giannechini, R.E., Lust, M., Gil, J., 2004. Seroepidemiology of neosporosis in dairy cattle in Uruguay. *Vet. Parasitol.* 120, 139–144.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.01.001>
- Kashiwazaki, Y., Pholpark, S., Charoenchai, A., Polsar, C., Teeverapanya, S., Pholpark, M., 2001. Postnatal neosporosis in dairy cattle in northeast Thailand. *Vet. Parasitol.* 94, 217–220.  
[https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(00\)00358-7](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(00)00358-7)
- Kengradomkij, C., Inpankaew, T., Kamyngkird, K., Wongpanit, K., Wongnakphet, S., Mitchell, T.J., Xuan, X., Igarashi, I., Jittapalpong, S., Stich, R.W., 2015. Seroprevalence and risk factors associated with exposure of water buffalo (*Bubalus bubalis*) to *Neospora caninum* in northeast Thailand. *Vet. Parasitol.* 207, 156–160.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.10.034>
- Khan, A., Shaik, J.S., Sikorski, P., Dubey, J.P., Grigg, M.E., 2020. Neosporosis: An Overview of Its Molecular Epidemiology and Pathogenesis. *Engineering* 6, 10–19.  
<https://doi.org/10.1016/j.eng.2019.02.010>
- King, J.S., Slapeta, J., Jenkins, D.J., Al-Qassab, S.E., Ellis, J.T., Windsor, P.A., 2010. Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* 40, 945–950.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.01.008>
- King, J.S., Vaughan, J.L., Windsor, P.A., 2015. Serological evidence of *Neospora caninum* in alpacas from eastern Australia. *Aust. Vet. J.* 93, 259–261.  
<https://doi.org/10.1111/avj.12339>
- Knowler, C., Wheeler, S.J., 1995. *Neospora caninum* infection in three dogs. *J. Small Anim. Pract.* 36, 172–177. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.1995.tb02875.x>
- Kobayashi, Y., Yamada, M., Omata, Y., Koyama, T., Saito, A., Matsuda, T., Okuyama, K., Fujimoto, S., Furuoka, H., Matsui, T., 2001. Naturally-occurring *Neospora caninum* infection in an adult sheep and her twin fetuses. *J. Parasitol.* 87, 434–436.  
[https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2001\)087\[0434:NONCII\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2001)087[0434:NONCII]2.0.CO;2)
- Koyama, T., Kobayashi, Y., Omata, Y., Yamada, M., Furuoka, H., Maeda, R., Matsui, T., Saito, A., Mikami, T., 2001. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a pregnant sheep. *J. Parasitol.* 87, 1486–1488. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2001\)087\[1486:IONCFT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2001)087[1486:IONCFT]2.0.CO;2)
- Kritzner, S., Sager, H., Blum, J., Kriebber, R., Greif, G., Gottstein, B., 2002. An explorative study to assess the efficacy of toltrazuril-sulfone (ponazuril) in calves experimentally infected

- with *Neospora caninum*. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 1, 4.  
<https://doi.org/10.1186/1476-0711-1-4>
- Kul, O., Atmaca, H.T., Anteplioglu, T., Ocal, N., Canpolat, S., 2015. *Neospora caninum*: the First Demonstration of the Enteroepithelial Stages in the Intestines of a Naturally Infected Dog. *J. Comp. Pathol.* 153, 9–13. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2015.03.005>
- La Perle, K.M., Del Piero, F., Carr, R.F., Harris, C., Stromberg, P.C., 2001. Cutaneous neosporosis in two adult dogs on chronic immunosuppressive therapy. *J. Vet. Diagn. Investig. Off. Publ. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagn. Inc* 13, 252–255.  
<https://doi.org/10.1177/104063870101300312>
- Landmann, J.K., Jillella, D., O'Donoghue, P.J., McGowan, M.R., 2002. Confirmation of the prevention of vertical transmission of *Neospora caninum* in cattle by the use of embryo transfer. *Aust. Vet. J.* 80, 502–503. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2002.tb12475.x>
- Larson, R.L., Hardin, D.K., Pierce, V.L., 2004. Economic considerations for diagnostic and control options for *Neospora caninum*-induced abortions in endemically infected herds of beef cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 224, 1597–1604.  
<https://doi.org/10.2460/javma.2004.224.1597>
- Leszkowicz Mazuz, M., Mimoun, L., Schvartz, G., Tirosch-Levy, S., Savitzki, I., Edery, N., Blum, S.E., Baneth, G., Pusterla, N., Steinman, A., 2020. Detection of *Neospora caninum* Infection in Aborted Equine Fetuses in Israel. *Pathog. Basel Switz.* 9, E962.  
<https://doi.org/10.3390/pathogens9110962>
- Liao, M., Zhang, S., Xuan, X., Zhang, G., Huang, X., Igarashi, I., Fujisaki, K., 2005. Development of Rapid Immunochromatographic Test with Recombinant NcSAG1 for Detection of Antibodies to *Neospora caninum* in Cattle. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 12, 885–887.  
<https://doi.org/10.1128/CDLI.12.7.885-887.2005>
- Lindsay, D., Dubey, J.P., 2000. Canine neosporosis. *J Vet Parasitol* 14, 1–11.
- Lindsay, D.S., Dubey, J.P., 2020. Neosporosis, Toxoplasmosis, and Sarcocystosis in Ruminants. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 36, 205–222.  
<https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2019.11.004>
- Lindsay, D.S., Dubey, J.P., 1990. Infections in mice with tachyzoites and bradyzoites of *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa). *J. Parasitol.* 76, 410–413.
- Lindsay, D.S., Dubey, J.P., 1989a. Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. *Am. J. Vet. Res.* 50, 1981–1983.
- Lindsay, D.S., Dubey, J.P., 1989b. Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. *Am. J. Vet. Res.* 50, 1981–1983.
- Lindsay, D.S., Dubey, J.P., Duncan, R.B., 1999a. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. *Vet. Parasitol.* 82, 327–333. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(99\)00054-0](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(99)00054-0)
- Lindsay, D.S., Rippey, N.S., Powe, T.A., Sartin, E.A., Dubey, J.P., Blagburn, B.L., 1995. Abortions, fetal death, and stillbirths in pregnant pygmy goats inoculated with tachyzoites of *Neospora caninum*. *Am. J. Vet. Res.* 56, 1176–1180.
- Lindsay, D.S., Ritter, D.M., Brake, D., 2001. Oocyst excretion in dogs fed mouse brains containing tissue cysts of a cloned line of *Neospora caninum*. *J. Parasitol.* 87, 909–911.  
[https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2001\)087\[0909:OEIDFM\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2001)087[0909:OEIDFM]2.0.CO;2)
- Lindsay, D.S., Steinberg, H., Dubielzig, R.R., Semrad, S.D., Konkle, D.M., Miller, P.E., Blagburn, B.L., 1996. Central nervous system neosporosis in a foal. *J. Vet. Diagn. Investig. Off. Publ. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagn. Inc* 8, 507–510.  
<https://doi.org/10.1177/104063879600800424>

- Lindsay, D.S., Upton, S.J., Dubey, J.P., 1999b. A structural study of the *Neospora caninum* oocyst. *Int. J. Parasitol.* 29, 1521–1523. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(99\)00121-6](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(99)00121-6)
- Liu, Z.-K., Li, J.-Y., Pan, H., 2015. Seroprevalence and risk factors of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in small ruminants in China. *Prev. Vet. Med.* 118, 488–492. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2014.12.017>
- Lobato, J., Silva, D.A.O., Mineo, T.W.P., Amaral, J.D.H.F., Segundo, G.R.S., Costa-Cruz, J.M., Ferreira, M.S., Borges, A.S., Mineo, J.R., 2006. Detection of Immunoglobulin G Antibodies to *Neospora caninum* in Humans: High Seropositivity Rates in Patients Who Are Infected by Human Immunodeficiency Virus or Have Neurological Disorders. *Clin. Vaccine Immunol.* 13, 84–89. <https://doi.org/10.1128/CVI.13.1.84-89.2006>
- López-Gatius, F., Almería, S., Donofrio, G., Nogareda, C., García-Ispuerto, I., Bech-Sàbat, G., Santolaria, P., Yániz, J.L., Pabón, M., de Sousa, N.M., Beckers, J.F., 2007a. Protection against abortion linked to gamma interferon production in pregnant dairy cows naturally infected with *Neospora caninum*. *Theriogenology* 68, 1067–1073. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.08.006>
- López-Gatius, F., Garbayo, J.M., Santolaria, P., Yániz, J.L., Almería, S., Ayad, A., de Sousa, N.M., Beckers, J.F., 2007b. Plasma pregnancy-associated glycoprotein-1 (PAG-1) concentrations during gestation in *Neospora*-infected dairy cows. *Theriogenology* 67, 502–508. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.08.014>
- López-Gatius, F., García-Ispuerto, I., Santolaria, P., Yániz, J.L., López-Béjar, M., Nogareda, C., Almería, S., 2005a. Relationship between rainfall and *Neospora caninum*-associated abortion in two dairy herds in a dry environment. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 52, 147–152. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.2005.00831.x>
- López-Gatius, F., López-Béjar, M., Murugavel, K., Pabón, M., Ferrer, D., Almería, S., 2004a. *Neospora*-associated abortion episode over a 1-year period in a dairy herd in north-east Spain. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 51, 348–352. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.2004.00779.x>
- López-Gatius, F., Pabón, M., Almería, S., 2004b. *Neospora caninum* infection does not affect early pregnancy in dairy cattle. *Theriogenology* 62, 606–613. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.11.002>
- López-Gatius, F., Santolaria, P., Almería, S., 2005b. *Neospora caninum* infection does not affect the fertility of dairy cows in herds with high incidence of *Neospora*-associated abortions. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 52, 51–53. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.2004.00811.x>
- López-Gatius, F., Santolaria, P., Yániz, J.L., Garbayo, J.M., Almería, S., 2005c. The use of beef bull semen reduced the risk of abortion in *Neospora*-seropositive dairy cows. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 52, 88–92. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.2004.00818.x>
- Löschenberger, K., Szölgényi, W., Peschke, R., Prosl, H., 2004. Detection of the protozoan *Neospora caninum* using in situ polymerase chain reaction. *Biotech. Histochem. Off. Publ. Biol. Stain Comm.* 79, 101–105. <https://doi.org/10.1080/10520290410001715246>
- Macaldowie, C., Maley, S.W., Wright, S., Bartley, P., Esteban-Redondo, I., Buxton, D., Innes, E.A., 2004. Placental pathology associated with fetal death in cattle inoculated with *Neospora caninum* by two different routes in early pregnancy. *J. Comp. Pathol.* 131, 142–156. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2004.02.005>
- Magnino, S., Vigo, P.G., Fabbi, M., Colombo, M., Bandi, C., Genchi, C., 1999. Isolation of a bovine *Neospora* from a newborn calf in Italy.. [Correspondence]. *Vet. Rec. U. K.*

- Maia, C., Cortes, H., Brancal, H., Lopes, A.P., Pimenta, P., Campino, L., Cardoso, L., 2014. Prevalence and correlates of antibodies to *Neospora caninum* in dogs in Portugal. *Parasite* 21, 29. <https://doi.org/10.1051/parasite/2014031>
- Mainar-Jaime, R., Thurmond, M., Berzal-Herranz, B., Hietala, S., 1999. Seroprevalence of *Neospora caninum* and abortion in dairy cows in northern Spain. *Vet. Rec.* 145, 72–5. <https://doi.org/10.1136/vr.145.3.72>
- Maley, S.W., Buxton, D., Macalodowie, C.N., Anderson, I.E., Wright, S.E., Bartley, P.M., Esteban-Redondo, I., Hamilton, C.M., Storset, A.K., Innes, E.A., 2006. Characterization of the immune response in the placenta of cattle experimentally infected with *Neospora caninum* in early gestation. *J. Comp. Pathol.* 135, 130–141. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2006.07.001>
- Maley, S.W., Buxton, D., Thomson, K.M., Schriefer, C.E., Innes, E.A., 2001. Serological analysis of calves experimentally infected with *Neospora caninum*: a 1-year study. *Vet. Parasitol.* 96, 1–9. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(00\)00428-3](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(00)00428-3)
- Malmasi, A., Hosseinijad, M., Haddadzadeh, H., Badii, A., Bahonar, A., 2007. Serologic study of anti-*Neospora caninum* antibodies in household dogs and dogs living in dairy and beef cattle farms in Tehran, Iran. *Parasitol. Res.* 100, 1143–1145. <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0385-7>
- Manca, R., Ciccarese, G., Scaltrito, D., Chirizzi, D., 2022. Detection of Anti-*Neospora caninum* Antibodies on Dairy Cattle Farms in Southern Italy. *Vet. Sci.* 9, 87. <https://doi.org/10.3390/vetsci9020087>
- Marsh, A.E., Barr, B.C., Madigan, J., Lakritz, J., Nordhausen, R., Conrad, P.A., 1996. Neosporosis as a cause of equine protozoal myeloencephalitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 209, 1907–1913.
- Marsh, A.E., Barr, B.C., Packham, A.E., Conrad, P.A., 1998. Description of a new *Neospora* species (Protozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae). *J. Parasitol.* 84, 983–991.
- Marugan-Hernandez, V., 2017. *Neospora caninum* and Bovine Neosporosis: Current Vaccine Research. *J. Comp. Pathol.* 157, 193–200. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2017.08.001>
- Mazuz, M.L., Haynes, R., Shkap, V., Fish, L., Wollkomirsky, R., Leibovich, B., Molad, T., Savitsky, I., Golenser, J., 2012. *Neospora caninum*: in vivo and in vitro treatment with artemisone. *Vet. Parasitol.* 187, 99–104. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.12.020>
- Mazuz, M.L., Leibovitz, B., Savitsky, I., Blinder, E., Yasur-Landau, D., Lavon, Y., Sharir, B., Tirosh-Levy, S., 2021. The Effect of Vaccination with *Neospora caninum* Live-Frozen Tachyzoites on Abortion Rates of Naturally Infected Pregnant Cows. *Vaccines* 9, 401. <https://doi.org/10.3390/vaccines9040401>
- McAllister, M., Parmley, S., Weiss, L., Welch, V., McGuire, A., 1996. An Immunohistochemical Method for Detecting Bradyzoite Antigen (BAG5) in *Toxoplasma gondii*-Infected Tissues Cross-React with a *Neospora caninum* Bradyzoite Antigen. *J. Parasitol.* 82, 354–5. <https://doi.org/10.2307/3284181>
- McAllister, M.M., 2016. Diagnosis and Control of Bovine Neosporosis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 32, 443–463. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2016.01.012>
- McAllister, M.M., Björkman, C., Anderson-Sprecher, R., Rogers, D.G., 2000. Evidence of point-source exposure to *Neospora caninum* and protective immunity in a herd of beef cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 217, 881–887. <https://doi.org/10.2460/javma.2000.217.881>
- McAllister, M.M., Dubey, J.P., Lindsay, D.S., Jolley, W.R., Wills, R.A., McGuire, A.M., 1998a. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* 28, 1473–1478.
- McAllister, M.M., Huffman, E.M., Hietala, S.K., Conrad, P.A., Anderson, M.L., Salman, M.D., 1996. Evidence suggesting a point source exposure in an outbreak of bovine abortion

- due to neosporosis. *J. Vet. Diagn. Investig. Off. Publ. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagn. Inc* 8, 355–357. <https://doi.org/10.1177/104063879600800313>
- McAllister, M.M., Jolley, W.R., Wills, R.A., Lindsay, D.S., McGuire, A.M., Tranas, J.D., 1998b. Oral inoculation of cats with tissue cysts of *Neospora caninum*. *Am. J. Vet. Res.* 59, 441–444.
- McCann, C.M., McAllister, M.M., Gondim, L.F.P., Smith, R.F., Cripps, P.J., Kipar, A., Williams, D.J.L., Trees, A.J., 2007. *Neospora caninum* in cattle: experimental infection with oocysts can result in exogenous transplacental infection, but not endogenous transplacental infection in the subsequent pregnancy. *Int. J. Parasitol.* 37, 1631–1639. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.05.012>
- McCann, C.M., Vyse, A.J., Salmon, R.L., Thomas, D., Williams, D.J.L., McGarry, J.W., Pebody, R., Trees, A.J., 2008. Lack of Serologic Evidence of *Neospora caninum* in Humans, England. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 978–980. <https://doi.org/10.3201/eid1406.071128>
- McGarry, J.W., Stockton, C.M., Williams, D.J.L., Trees, A.J., 2003. Protracted shedding of oocysts of *Neospora caninum* by a naturally infected foxhound. *J. Parasitol.* 89, 628–630. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2003\)089\[0628:PSOON\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2003)089[0628:PSOON]2.0.CO;2)
- McInnes, L.M., Irwin, P., Palmer, D.G., Ryan, U.M., 2006. In vitro isolation and characterisation of the first canine *Neospora caninum* isolate in Australia. *Vet. Parasitol.* 137, 355–363. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.018>
- Medina, L., Cruz-Vázquez, C., Quezada, T., Morales, E., García-Vázquez, Z., 2006. Survey of *Neospora caninum* infection by nested PCR in aborted fetuses from dairy farms in Aguascalientes, Mexico. *Vet. Parasitol.* 136, 187–191. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.11.003>
- Mee, J.F., 2020. Investigation of bovine abortion and stillbirth/perinatal mortality - similar diagnostic challenges, different approaches. *Ir. Vet. J.* 73, 20. <https://doi.org/10.1186/s13620-020-00172-0>
- Meek, P., 1999. The movement, roaming behavior and home range of free-roaming domestic dogs, *Canis lupus familiaris*, in coastal New South Wales. *Wildl. Res.* 26, 847–855. <https://doi.org/10.1071/WR97101>
- Miller, C.M., Boulter, N.R., Ikin, R.J., Smith, N.C., 2009. The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 39, 23–39. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.08.002>
- Modrý, D., Václavěk, P., Koudela, B., Šlapeta, J.R., 2001. Placentophagia – an alternative way for horizontal transmission of *Neospora caninum* in cattle? *Trends Parasitol.* 17, 573. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(01\)02144-4](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(01)02144-4)
- Moen, A.R., Wouda, W., Mul, M.F., Graat, E.A., van Werven, T., 1998. Increased risk of abortion following *Neospora caninum* abortion outbreaks: a retrospective and prospective cohort study in four dairy herds. *Theriogenology* 49, 1301–1309. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(98\)00077-6](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00077-6)
- Monney, T., Debache, K., Hemphill, A., 2011. Vaccines against a Major Cause of Abortion in Cattle, *Neospora caninum* Infection. *Anim. Open Access J. MDPI* 1, 306–325. <https://doi.org/10.3390/ani1030306>
- Monney, T., Hemphill, A., 2014. Vaccines against neosporosis: what can we learn from the past studies? *Exp. Parasitol.* 140, 52–70. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2014.02.015>
- Moore, D., Reichel, M., Spath, E., Campero, C., 2013. *Neospora caninum* causes severe economic losses in cattle in the humid pampa region of Argentina. *Trop. Anim. Health Prod.* 45, 1237–1241. <https://doi.org/10.1007/s11250-013-0353-z>
- Moore, D.P., Leunda, M.R., Zamorano, P.I., Odeón, A.C., Romera, S.A., Cano, A., de Yaniz, G., Venturini, M.C., Campero, C.M., 2005. Immune response to *Neospora caninum* in naturally infected heifers and heifers vaccinated with inactivated antigen during the



- second trimester of gestation. *Vet. Parasitol.* 130, 29–39.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.03.010>
- Moraveji, M., Hosseini, A., Moghaddar, N., Namavari, M.M., Eskandari, M.H., 2012. Development of latex agglutination test with recombinant NcSAG1 for the rapid detection of antibodies to *Neospora caninum* in cattle. *Vet. Parasitol.* 189, 211–217.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.04.010>
- Moreno, B., Collantes-Fernández, E., Villa, A., Navarro, A., Regidor-Cerrillo, J., Ortega-Mora, L.M., 2012. Occurrence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infections in ovine and caprine abortions. *Vet. Parasitol.* 187, 312–318.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.12.034>
- Mosallanejad, B., Bahrami, S., Hamidinejat, H., Ghanavati, S., 2018. A Serological Survey of *Neospora caninum* Infection in Urban and Rural Dogs in Ahvaz District, Southwest of Iran. *Arch. Razi Inst.* 73, 215–221. <https://doi.org/10.22092/ari.2017.107498.1069>
- Moskwa, B., Cabaj, W., Pastusiak, K., Bień, J., 2003. The suitability of milk in detection of *Neospora caninum* infection in cows. *Acta Parasitol.* 48, 138–141.
- Moskwa, B., Pastusiak, K., Bien, J., Cabaj, W., 2007. The first detection of *Neospora caninum* DNA in the colostrum of infected cows. *Parasitol. Res.* 100, 633–636.  
<https://doi.org/10.1007/s00436-006-0288-7>
- Müller, J., Aguado-Martinez, A., Manser, V., Balmer, V., Winzer, P., Ritler, D., Hostettler, I., Arranz-Solís, D., Ortega-Mora, L., Hemphill, A., 2015. Buparvaquone is active against *Neospora caninum* in vitro and in experimentally infected mice. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* 5, 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2015.02.001>
- Müller, N., Zimmermann, V., Hentrich, B., Gottstein, B., 1996. Diagnosis of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infection by PCR and DNA hybridization immunoassay. *J. Clin. Microbiol.* 34, 2850–2852.
- Muñoz-Zanzi, C.A., Thurmond, M.C., Hietala, S.K., 2004. Effect of bovine viral diarrhea virus infection on fertility of dairy heifers. *Theriogenology* 61, 1085–1099.  
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.06.003>
- Nasir, A., Ashraf, M., Khan, M.S., Yaqub, T., Javeed, A., Avais, M., Akhtar, F., 2011. Seroprevalence of *Neospora caninum* in Dairy Buffaloes in Lahore District, Pakistan. *J. Parasitol.* 97, 541–543.
- Neverauskas, C.E., Nasir, A., Reichel, M.P., 2015. Prevalence and distribution of *Neospora caninum* in water buffalo (*Bubalus bubalis*) and cattle in the Northern Territory of Australia. *Parasitol. Int.* 64, 392–396. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2015.05.009>
- Neville, A.J., Zach, S.J., Wang, X., Larson, J.J., Judge, A.K., Davis, L.A., Vennerstrom, J.L., Davis, P.H., 2015. Clinically Available Medicines Demonstrating Anti-*Toxoplasma* Activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 7161–7169. <https://doi.org/10.1128/AAC.02009-15>
- New York State College of Veterinary Medicine, 1911. *The Cornell veterinarian.* v.
- Nielsen, U.S., Aamand, G.P., Andersen, O., Bendixen, C., Nielsen, V.H., Agerholm, J.S., 2003. Effects of complex vertebral malformation on fertility traits in Holstein cattle. *Livest. Prod. Sci.* 79, 233–238. [https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(02\)00170-7](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(02)00170-7)
- Nietfeld, J.C., Dubey, J.P., Anderson, M.L., Libal, M.C., Yaeger, M.J., Neiger, R.D., 1992. *Neospora*-like protozoan infection as a cause of abortion in dairy cattle. *J. Vet. Diagn. Investig. Off. Publ. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagn. Inc* 4, 223–226.  
<https://doi.org/10.1177/104063879200400228>
- Nishikawa, Y., 2017. Towards a preventive strategy for neosporosis: challenges and future perspectives for vaccine development against infection with *Neospora caninum*. *J. Vet. Med. Sci.* 79, 1374–1380. <https://doi.org/10.1292/jvms.17-0285>

- Nishikawa, Y., Mikami, T., Nagasawa, H., 2002. Vaccine development against *Neospora caninum* infection. *J. Vet. Med. Sci.* 64, 1–5. <https://doi.org/10.1292/jvms.64.1>
- O’Handley, R., Liddell, S., Parker, C., Jenkins, M.C., Dubey, J.P., 2002. Experimental Infection of Sheep with *Neospora caninum* Oocysts. *J. Parasitol.* 88, 1120–1123. <https://doi.org/10.2307/3285481>
- Ojo, K.K., Reid, M.C., Siddaramaiah, L.K., Müller, J., Winzer, P., Zhang, Z., Keyloun, K.R., Vidadala, R.S.R., Merritt, E.A., Hol, W.G.J., Maly, D.J., Fan, E., Voorhis, W.C.V., Hemphill, A., 2014. *Neospora caninum* Calcium-Dependent Protein Kinase 1 Is an Effective Drug Target for Neosporosis Therapy. *PLOS ONE* 9, e92929. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092929>
- Okeoma, C., Williamson, N., Pomroy, W., Stowell, K., Gillespie, L., 2004. Isolation and molecular characterisation of *Neospora caninum* in cattle in New Zealand. *N. Z. Vet. J.* 52, 364–370. <https://doi.org/10.1080/00480169.2004.36453>
- Okeoma, C.M., Stowell, K.M., Williamson, N.B., Pomroy, W.E., 2005. *Neospora caninum*: quantification of DNA in the blood of naturally infected aborted and pregnant cows using real-time PCR. *Exp. Parasitol.* 110, 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2005.01.008>
- Ordeix, L., Lloret, A., Fondevila, D., Dubey, J.P., Ferrer, L., Fondati, A., 2002. Cutaneous neosporosis during treatment of pemphigus foliaceus in a dog. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 38, 415–419. <https://doi.org/10.5326/0380415>
- Ortega-Mora, L., Fernández-García, A., Gómez-Bautista, M., 2006. Diagnosis of bovine neosporosis: Recent advances and perspectives. *Acta Parasitol.* 51, 1–14. <https://doi.org/10.2478/s11686-006-0001-0>
- Ortega-Mora, L.M., Ferre, I., del-Pozo, I., Caetano-da-Silva, A., Collantes-Fernández, E., Regidor-Cerrillo, J., Ugarte-Garagalza, C., Aduriz, G., 2003. Detection of *Neospora caninum* in semen of bulls. *Vet. Parasitol.* 117, 301–308. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.09.015>
- Ortuño, A., Castellà, J., Almería, S., 2002. Seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs from Spain. *J. Parasitol.* 88, 1263–1266. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2002\)088\[1263:SOATNC\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2002)088[1263:SOATNC]2.0.CO;2)
- Osawa, T., Wastling, J., Maley, S., Buxton, D., Innes, E.A., 1998. A multiple antigen ELISA to detect *Neospora*-specific antibodies in bovine sera, bovine foetal fluids, ovine and caprine sera. *Vet. Parasitol.* 79, 19–34. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(98\)00156-3](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(98)00156-3)
- Oshiro, L.M., Motta-Castro, A.R.C., Freitas, S.Z., Cunha, R.C., Dittrich, R.L., Meirelles, A.C.F., Andreotti, R., 2015. *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* serodiagnosis in human immunodeficiency virus carriers. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 48, 568–572. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0151-2015>
- Osoro, K., Ortega-Mora, L.M., Martínez, A., Serrano-Martínez, E., Ferre, I., 2009. Natural breeding with bulls experimentally infected with *Neospora caninum* failed to induce seroconversion in dams. *Theriogenology* 71, 639–642. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.09.035>
- O’Toole, D., Jeffrey, M., 1987. Congenital sporozoan encephalomyelitis in a calf. *Vet. Rec.* 121, 563–566.
- Otranto, D., Llazari, A., Testini, G., Traversa, D., Frangipane di Regalbono, A., Badan, M., Capelli, G., 2003. Seroprevalence and associated risk factors of neosporosis in beef and dairy cattle in Italy. *Vet. Parasitol.* 118, 7–18. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.10.008>

- Otter, A., Jeffrey, M., Griffiths, I.B., Dubey, J.P., 1995. A survey of the incidence of *Neospora caninum* infection in aborted and stillborn bovine fetuses in England and Wales. *Vet. Rec.* 136, 602–606. <https://doi.org/10.1136/vr.136.24.602>
- Otter, A., Jeffrey, M., Scholes, S.F., Helmick, B., Wilesmith, J.W., Trees, A.J., 1997. Comparison of histology with maternal and fetal serology for the diagnosis of abortion due to bovine neosporosis. *Vet. Rec.* 141, 487–489. <https://doi.org/10.1136/vr.141.19.487>
- Ould-Amrouche, A., Klein, F., Osdoit, C., Mohammed, H.O., Touratier, A., Sanaa, M., Mialot, J.P., 1999. Estimation of *Neospora caninum* seroprevalence in dairy cattle from Normandy, France. *Vet. Res.* 30, 531–538.
- Packham, A.E., Conrad, P.A., Wilson, W.D., Jeanes, L.V., Sverlow, K.W., Gardner, I.A., Daft, B.M., Marsh, A.E., Blagburn, B.L., Ferraro, G.L., Barr, B.C., 2002. Qualitative evaluation of selective tests for detection of *Neospora hughesi* antibodies in serum and cerebrospinal fluid of experimentally infected horses. *J. Parasitol.* 88, 1239–1246. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2002\)088\[1239:QEOSTF\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2002)088[1239:QEOSTF]2.0.CO;2)
- Packham, A.E., Sverlow, K.W., Conrad, P.A., Loomis, E.F., Rowe, J.D., Anderson, M.L., Marsh, A.E., Cray, C., Barr, B.C., 1998. A modified agglutination test for *Neospora caninum*: development, optimization, and comparison to the indirect fluorescent-antibody test and enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 5, 467–473. <https://doi.org/10.1128/CDLI.5.4.467-473.1998>
- Paradies, P., Capelli, G., Testini, G., Cantacessi, C., Trees, A.J., Otranto, D., 2007. Risk factors for canine neosporosis in farm and kennel dogs in southern Italy. *Vet. Parasitol.* 145, 240–244. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.12.013>
- Paré, J., Fecteau, G., Fortin, M., Marsolais, G., 1998. Seroepidemiologic study of *Neospora caninum* in dairy herds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 213, 1595–1598.
- Paré, J., Hietala, S.K., Thurmond, M.C., 1995. Interpretation of an indirect fluorescent antibody test for diagnosis of *Neospora* sp. infection in cattle. *J. Vet. Diagn. Investig. Off. Publ. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagn. Inc* 7, 273–275. <https://doi.org/10.1177/104063879500700222>
- Paré, J., Thurmond, M.C., Hietala, S.K., 1997. *Neospora caninum* antibodies in cows during pregnancy as a predictor of congenital infection and abortion. *J. Parasitol.* 83, 82–87.
- Paré, J., Thurmond, M.C., Hietala, S.K., 1996. Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calfhood mortality. *Can. J. Vet. Res.* 60, 133–139.
- Parish, S.M., Maag-Miller, L., Besser, T.E., Weidner, J.P., McElwain, T., Knowles, D.P., Leathers, C.W., 1987. Myelitis associated with protozoal infections in newborn calves. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 191, 1599–1600.
- Pereira-Bueno, J., Quintanilla-Gozalo, A., Pérez-Pérez, V., Espi-Felgueroso, A., Alvarez-García, G., Collantes-Fernández, E., Ortega-Mora, L.M., 2003. Evaluation by different diagnostic techniques of bovine abortion associated with *Neospora caninum* in Spain. *Vet. Parasitol.* 111, 143–152. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(02\)00361-8](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(02)00361-8)
- Peters, M., Lütkefels, E., Heckerth, A.R., Schares, G., 2001. Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle. *Int. J. Parasitol.* 31, 1144–1148. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(01\)00221-1](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(01)00221-1)
- Pfeiffer, D.U., Williamson, N.B., Reichel, M.P., Wichtel, J.J., Teague, W.R., 2002. A longitudinal study of *Neospora caninum* infection on a dairy farm in New Zealand. *Prev. Vet. Med.* 54, 11–24. [https://doi.org/10.1016/s0167-5877\(02\)00011-9](https://doi.org/10.1016/s0167-5877(02)00011-9)
- Piagentini, M., Moya-Araujo, C.F., Prestes, N.C., Sartor, I.F., 2012. *Neospora caninum* infection dynamics in dairy cattle. *Parasitol. Res.* 111, 717–721. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-2891-0>

- Piergili Fioretti, D., Pasquali, P., Diaferia, M., Mangili, V., Rosignoli, L., 2003. Neospora caninum infection and congenital transmission: serological and parasitological study of cows up to the fourth gestation. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 50, 399–404. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0450.2003.00686.x>
- Pitel, P.H., Pronost, S., Chatagnon, G., Tainturier, D., Fortier, G., Ballet, J.J., 2001. Neosporosis in bovine dairy herds from the west of France: detection of Neospora caninum DNA in aborted fetuses, seroepidemiology of N. caninum in cattle and dogs. *Vet. Parasitol.* 102, 269–277. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(01\)00544-1](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(01)00544-1)
- Polak, J.M., Van Noorden, S., 2003. Introduction to immunocytochemistry. BIOS Scientific Publishers, Oxford.
- Pusterla, N., Conrad, P.A., Packham, A.E., Mapes, S.M., Finno, C.J., Gardner, I.A., Barr, B.C., Ferraro, G.L., Wilson, W.D., 2011. Endogenous transplacental transmission of Neospora hughesi in naturally infected horses. *J. Parasitol.* 97, 281–285. <https://doi.org/10.1645/GE-2657.1>
- Quinn, H.E., Ellis, J.T., Smith, N.C., 2002. Neospora caninum: a cause of immune-mediated failure of pregnancy? *Trends Parasitol.* 18, 391–394. [https://doi.org/10.1016/s1471-4922\(02\)02324-3](https://doi.org/10.1016/s1471-4922(02)02324-3)
- Quintanilla-Gozaolo, A., Pereira-Bueno, J., Seijas-Carballedo, A., Costas, E., Ortega-Mora, L., 2000. Observational studies in Neospora caninum infected dairy cattle: relationship infection-abortion and gestational antibody fluctuations. *Int J Parasitol* 30, 900–906.
- Rahmani, S.S., Malekifard, F., Tavassoli, M., 2022. Neospora caninum, a cause of abortion in donkeys (*Equus asinus*) in Iran. *Parasitol. Res.* 121, 367–372. <https://doi.org/10.1007/s00436-021-07383-6>
- Reed, S.M., Furr, M., Howe, D.K., Johnson, A.L., MacKay, R.J., Morrow, J.K., Pusterla, N., Witonsky, S., 2016. Equine Protozoal Myeloencephalitis: An Updated Consensus Statement with a Focus on Parasite Biology, Diagnosis, Treatment, and Prevention. *J. Vet. Intern. Med.* 30, 491–502. <https://doi.org/10.1111/jvim.13834>
- Regidor-Cerrillo, J., Arranz-Solís, D., Benavides, J., Gómez-Bautista, M., Castro-Hermida, J.A., Mezo, M., Pérez, V., Ortega-Mora, L.M., González-Warleta, M., 2014. Neospora caninum infection during early pregnancy in cattle: how the isolate influences infection dynamics, clinical outcome and peripheral and local immune responses. *Vet. Res.* 45, 10. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-45-10>
- Regidor-Cerrillo, J., Pedraza-Díaz, S., Rojo-Montejo, S., Vazquez-Moreno, E., Arnaiz, I., Gomez-Bautista, M., Jimenez-Palacios, S., Ortega-Mora, L.M., Collantes-Fernandez, E., 2010. Neospora caninum infection in stray and farm dogs: seroepidemiological study and oocyst shedding. *Vet. Parasitol.* 174, 332–335. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.08.033>
- Reichel, M.P., 2000. Neospora caninum infections in Australia and New Zealand. *Aust. Vet. J.* 78, 258–261. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2000.tb11751.x>
- Reichel, M.P., Alejandra Ayanegui-Alcérreca, M., Gondim, L.F.P., Ellis, J.T., 2013. What is the global economic impact of Neospora caninum in cattle – The billion dollar question. *Int. J. Parasitol.* 43, 133–142. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.10.022>
- Reichel, M.P., Ellis, J.T., 2009. Neospora caninum--how close are we to development of an efficacious vaccine that prevents abortion in cattle? *Int. J. Parasitol.* 39, 1173–1187. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.05.007>
- Reichel, M.P., Ellis, J.T., 2002. Control options for Neospora caninum infections in cattle--current state of knowledge. *N. Z. Vet. J.* 50, 86–92. <https://doi.org/10.1080/00480169.2002.36288>
- Reichel, M.P., Ellis, J.T., Dubey, J.P., 2007. Neosporosis and hammondiosis in dogs. *J. Small Anim. Pract.* 48, 308–312. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2006.00236.x>

- Reichel, M.P., Moore, D.P., Hemphill, A., Ortega-Mora, L.M., Dubey, J.P., Ellis, J.T., 2015. A live vaccine against *Neospora caninum* abortions in cattle. *Vaccine* 33, 1299–1301. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.01.064>
- Reichel, M.P., Pfeiffer, D.U., 2002. An analysis of the performance characteristics of serological tests for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in cattle. *Vet. Parasitol.* 107, 197–207. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(02\)00086-9](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(02)00086-9)
- Reiczigel, J., Földi, J., Ozsvári, L., 2010. Exact confidence limits for prevalence of a disease with an imperfect diagnostic test. *Epidemiol. Infect.* 138, 1674–1678. <https://doi.org/10.1017/S0950268810000385>
- Rinaldi, L., Fusco, G., Musella, V., Veneziano, V., Guarino, A., Taddei, R., Cringoli, G., 2005. *Neospora caninum* in pastured cattle: determination of climatic, environmental, farm management and individual animal risk factors using remote sensing and geographical information systems. *Vet. Parasitol.* 128, 219–230. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.12.011>
- Risco-Castillo, V., Marugán-Hernández, V., Fernández-García, A., Aguado-Martínez, A., Jiménez-Ruiz, E., Rodríguez-Marco, S., Alvarez-García, G., Ortega-Mora, L.M., 2011. Identification of a gene cluster for cell-surface genes of the SRS superfamily in *Neospora caninum* and characterization of the novel SRS9 gene. *Parasitology* 138, 1832–1842. <https://doi.org/10.1017/S0031182011001351>
- Rogan, W.J., Gladen, B., 1978. Estimating prevalence from the results of a screening test. *Am. J. Epidemiol.* 107, 71–76. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a112510>
- Rojo-Montejo, S., Collantes-Fernández, E., Blanco-Murcia, J., Rodríguez-Bertos, A., Risco-Castillo, V., Ortega-Mora, L.M., 2009. Experimental infection with a low virulence isolate of *Neospora caninum* at 70 days gestation in cattle did not result in foetopathy. *Vet. Res.* 40, 49. <https://doi.org/10.1051/vetres/2009032>
- Romand, S., Thulliez, P., Dubey, J.P., 1998. Direct agglutination test for serologic diagnosis of *Neospora caninum* infection. *Parasitol. Res.* 84, 50–53. <https://doi.org/10.1007/s004360050355>
- Romero, J.J., Breda, S.V., Vargas, B., Dolz, G., Frankena, K., 2005. Effect of neosporosis on productive and reproductive performance of dairy cattle in Costa Rica. *Theriogenology* 64, 1928–1939. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.03.023>
- Romero, J.J., Perez, E., Dolz, G., Frankena, K., 2002. Factors associated with *Neospora caninum* serostatus in cattle of 20 specialised Costa Rican dairy herds. *Prev. Vet. Med.* 53, 263–273. [https://doi.org/10.1016/s0167-5877\(01\)00290-2](https://doi.org/10.1016/s0167-5877(01)00290-2)
- Romero, J.J., Pérez, E., Frankena, K., 2004. Effect of a killed whole *Neospora caninum* tachyzoite vaccine on the crude abortion rate of Costa Rican dairy cows under field conditions. *Vet. Parasitol.* 123, 149–159. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.06.016>
- Rosbottom, A., Gibney, E.H., Guy, C.S., Kipar, A., Smith, R.F., Kaiser, P., Trees, A.J., Williams, D.J.L., 2008. Upregulation of cytokines is detected in the placentas of cattle infected with *Neospora caninum* and is more marked early in gestation when fetal death is observed. *Infect. Immun.* 76, 2352–2361. <https://doi.org/10.1128/IAI.01780-06>
- Rosbottom, A., Gibney, H., Kaiser, P., Hartley, C., Smith, R.F., Robinson, R., Kipar, A., Williams, D.J.L., 2011. Up Regulation of the Maternal Immune Response in the Placenta of Cattle Naturally Infected with *Neospora caninum*. *PLOS ONE* 6, e15799. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015799>
- Rosypal, A.C., Lindsay, D.S., 2005. The sylvatic cycle of *Neospora caninum*: where do we go from here? *Trends Parasitol.* 21, 439–440. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.08.003>
- Saey, V., Martlé, V., Van Ham, L., Chiers, K., 2010. Neuritis of the cauda equina in a dog. *J. Small Anim. Pract.* 51, 549–552. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2010.00976.x>

- Sager, H., Fischer, I., Furrer, K., Strasser, M., Waldvogel, A., Boerlin, P., Audigé, L., Gottstein, B., 2001. A Swiss case-control study to assess *Neospora caninum*-associated bovine abortions by PCR, histopathology and serology. *Vet. Parasitol.* 102, 1–15. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(01\)00524-6](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(01)00524-6)
- Sager, H., Gloor, M., Björkman, C., Kritznier, S., Gottstein, B., 2003. Assessment of antibody avidity in aborting cattle by a somatic *Neospora caninum* tachyzoite antigen IgG avidity ELISA. *Vet. Parasitol.* 112, 1–10. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(02\)00416-8](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(02)00416-8)
- Sager, H., Hüsey, D., Kuffer, A., Schreve, F., Gottstein, B., 2005. Mise en évidence d'un cas de «abortion storm» (transmission transplacentaire exogène de *Neospora caninum*) dans une exploitation de vaches laitières: une première en Suisse. *Schweiz. Arch. Für Tierheilkd.* 147, 113–120. <https://doi.org/10.1024/0036-7281.147.3.113>
- Salant, H., Mazuz, M.L., Savitsky, I., Nasereddin, A., Blinder, E., Baneth, G., 2015. *Neospora caninum* in crows from Israel. *Vet. Parasitol.* 212, 375–378. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.08.019>
- Sánchez-Sánchez, R., Vázquez, P., Ferre, I., Ortega-Mora, L.M., 2018. Treatment of Toxoplasmosis and Neosporosis in Farm Ruminants: State of Knowledge and Future Trends. *Curr. Top. Med. Chem.* 18, 1304–1323. <https://doi.org/10.2174/1568026618666181002113617>
- Sanderson, M.W., Gay, J.M., Baszler, T.V., 2000. *Neospora caninum* seroprevalence and associated risk factors in beef cattle in the northwestern United States. *Vet. Parasitol.* 90, 15–24. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(00\)00234-x](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(00)00234-x)
- Santolaria, P., López-Gatius, F., Yáñez, J., García-Ispuerto, I., Nogareda, C., Bech-Sàbat, G., Serrano, B., Almeria, S., 2009. Early postabortion recovery of *Neospora*-infected lactating dairy cows. *Theriogenology* 72, 798–802. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.05.014>
- Sawada, M., Kondo, H., Tomioka, Y., Park, C., Morita, T., Shimada, A., Umemura, T., 2000. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected adult dairy cow. *Vet. Parasitol.* 90, 247–252. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(00\)00248-x](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(00)00248-x)
- Sawada, M., Park, C.H., Kondo, H., Morita, T., Shimada, A., Yamane, I., Umemura, T., 1998. Serological survey of antibody to *Neospora caninum* in Japanese dogs. *J. Vet. Med. Sci.* 60, 853–854. <https://doi.org/10.1292/jvms.60.853>
- Schares, G., Bärwald, A., Staubach, C., Söndgen, P., Rauser, M., Schröder, R., Peters, M., Wurm, R., Selhorst, T., Conraths, F.J., 2002. p38-avidity-ELISA: examination of herds experiencing epidemic or endemic *Neospora caninum*-associated bovine abortion. *Vet. Parasitol.* 106, 293–305. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(02\)00103-6](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(02)00103-6)
- Schares, G., Bärwald, A., Staubach, C., Wurm, R., Rauser, M., Conraths, F.J., Schroeder, C., 2004a. Adaptation of a commercial ELISA for the detection of antibodies against *Neospora caninum* in bovine milk. *Vet. Parasitol.* 120, 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.11.016>
- Schares, G., Bärwald, A., Staubach, C., Ziller, M., Klöss, D., Schröder, R., Labohm, R., Dräger, K., Fasen, W., Hess, R.G., Conraths, F.J., 2004b. Potential risk factors for bovine *Neospora caninum* infection in Germany are not under the control of the farmers. *Parasitology* 129, 301–309. <https://doi.org/10.1017/s0031182004005700>
- Schares, G., Bärwald, A., Staubach, C., Ziller, M., Klöss, D., Wurm, R., Rauser, M., Labohm, R., Dräger, K., Fasen, W., Hess, R.G., Conraths, F.J., 2003. Regional distribution of bovine *Neospora caninum* infection in the German state of Rhineland-Palatinate modelled by Logistic regression. *Int. J. Parasitol.* 33, 1631–1640. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(03\)00266-2](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(03)00266-2)

- Schares, G., Conraths, F.J., 2001. Placentophagia – an alternative way for horizontal transmission of *Neospora caninum* in cattle? *Trends Parasitol.* 17, 574–575. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(01\)02145-6](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(01)02145-6)
- Schares, G., Heydorn, A.O., Cüppers, A., Conraths, F.J., Mehlhorn, H., 2001a. *Hammondia heydorni*-like oocysts shed by a naturally infected dog and *Neospora caninum* NC-1 cannot be distinguished. *Parasitol. Res.* 87, 808–816. <https://doi.org/10.1007/s004360100445>
- Schares, G., Heydorn, A.O., Cüppers, A., Conraths, F.J., Mehlhorn, H., 2001b. Cyclic transmission of *Neospora caninum*: serological findings in dogs shedding oocysts. *Parasitol. Res.* 87, 873–877. <https://doi.org/10.1007/s004360100459>
- Schares, G., Pantchev, N., Barutzki, D., Heydorn, A.O., Bauer, C., Conraths, F.J., 2005. Oocysts of *Neospora caninum*, *Hammondia heydorni*, *Toxoplasma gondii* and *Hammondia hammondi* in faeces collected from dogs in Germany. *Int. J. Parasitol.* 35, 1525–1537. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.08.008>
- Schares, G., Peters, M., Wurm, R., Bärwald, A., Conraths, F.J., 1998. The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analysed by serological techniques. *Vet. Parasitol.* 80, 87–98. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(98\)00195-2](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(98)00195-2)
- Schares, G., Rauser, M., Söndgen, P., Rehberg, P., Bärwald, A., Dubey, J.P., Edelhofer, R., Conraths, F.J., 2000. Use of purified tachyzoite surface antigen p38 in an ELISA to diagnose bovine neosporosis. *Int. J. Parasitol.* 30, 1123–1130. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(00\)00092-8](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(00)00092-8)
- Schares, G., Rauser, M., Zimmer, K., Peters, M., Wurm, R., Dubey, J.P., de Graaf, D.C., Edelhofer, R., Mertens, C., Hess, G., Conraths, F.J., 1999. Serological differences in *Neospora caninum*-associated epidemic and endemic abortions. *J. Parasitol.* 85, 688–694.
- Schmidt, A.C., Pacheco, T. dos A., Barddal, J.E.I., Oliveira, A.C.S. de, Aguiar, D.M. de, Negreiros, R.L., Pacheco, R. de C., 2018. Seroprevalence, spatial analysis and risk factors of infection with *Neospora caninum* in cattle in Brazil's northern Pantanal wetland. *Rev. Bras. Parasitol. Veterinária* 27, 455–463.
- Sergeant, E.S.G., 2018. *Epitools Epidemiological Calculators*.
- Serrano, E., Ferre, I., Osoro, K., Aduriz, G., Mateos-Sanz, A., Martínez, A., Atxaerandio, R., Hidalgo, C.O., Ortega-Mora, L.M., 2006. Intrauterine *Neospora caninum* inoculation of heifers. *Vet. Parasitol.* 135, 197–203. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.10.003>
- Serrano, E., Ferre, I., Osoro, K., Aduriz, G., Mota, R.A., Martínez, A., Del-Pozo, I., Hidalgo, C.O., Ortega-Mora, L.M., 2007. Intrauterine *Neospora caninum* inoculation of heifers and cows using contaminated semen with different numbers of tachyzoites. *Theriogenology* 67, 729–737. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.10.004>
- Shaapan, R.M., 2016. The common zoonotic protozoal diseases causing abortion. *J. Parasit. Dis. Off. Organ Indian Soc. Parasitol.* 40, 1116–1129. <https://doi.org/10.1007/s12639-015-0661-5>
- Shivaprasad, H.L., Ely, R., Dubey, J.P., 1989. A *Neospora*-like protozoon found in an aborted bovine placenta. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Rep.* 34, 145–148. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(89\)90174-X](https://doi.org/10.1016/0304-4017(89)90174-X)
- Shkap, V., Reske, A., Pipano, E., Fish, L., Baszler, T., 2002. Immunological relationship between *Neospora caninum* and *Besnoitia besnoiti*. *Vet. Parasitol.* 106, 35–43. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(02\)00030-4](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(02)00030-4)
- Silva, D.A.O., Lobato, J., Mineo, T.W.P., Mineo, J.R., 2007. Evaluation of serological tests for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in dogs: optimization of cut off titers and inhibition studies of cross-reactivity with *Toxoplasma gondii*. *Vet. Parasitol.* 143, 234–244. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.08.028>

- Silva, R.C., Machado, G.P., 2016. Canine neosporosis: perspectives on pathogenesis and management. *Vet. Med. Res. Rep.* 7, 59–70. <https://doi.org/10.2147/VMRR.S76969>
- Slapeta, J.R., Modrý, D., Kyselová, I., Horejs, R., Lukes, J., Koudela, B., 2002. Dog shedding oocysts of *Neospora caninum*: PCR diagnosis and molecular phylogenetic approach. *Vet. Parasitol.* 109, 157–167. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(02\)00273-x](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(02)00273-x)
- Sloan, S., Šlapeta, J., Jabbar, A., Hunnam, J., De Groef, B., Rawlin, G., McCowan, C., 2017. High seroprevalance of *Neospora caninum* in dogs in Victoria, Australia, compared to 20 years ago. *Parasit. Vectors* 10, 503. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2464-2>
- Slotved, H.C., Jensen, L., Lind, P., 1999. Comparison of the IFAT and Iscom-ELISA response in bovine foetuses with *Neospora caninum* infection. *Int. J. Parasitol.* 29, 1165–1174. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(99\)00095-8](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(99)00095-8)
- Söndgen, P., Peters, M., Bärwald, A., Wurm, R., Holling, F., Conraths, F.J., Schares, G., 2001. Bovine neosporosis: immunoblot improves foetal serology. *Vet. Parasitol.* 102, 279–290. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00543-X](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00543-X)
- Sparkes, J., Körtner, G., Ballard, G., Fleming, P., Brown, W., 2014. Effects of Sex and Reproductive State on Interactions between Free-Roaming Domestic Dogs. *PloS One* 9, e116053. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116053>
- Speer, C.A., Dubey, J.P., McAllister, M.M., Blixt, J.A., 1999. Comparative ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites, and tissue cysts of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 29, 1509–1519. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(99\)00132-0](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(99)00132-0)
- SRADR, 2021. Portal do Leite - Estatísticas do leite e laticíneos dos Açores (Relatório Estatístico). Secretaria Regional da Agricultura e do Desenvolvimento Rural, Horta.
- SREA, 2021. SREA - Resultados Preliminares dos Censos 2021 nos Açores (Relatório Estatístico).
- Stenlund, S., 2000. *Neospora caninum* in cattle in Sweden (Doctoral thesis No. 85). Swedish University of Agricultural Sciences Uppsala, Uppsala.
- Stenlund, S., Kindahl, H., Magnusson, U., Ugglå, A., Björkman, C., 1999. Serum antibody profile and reproductive performance during two consecutive pregnancies of cows naturally infected with *Neospora caninum*. *Vet. Parasitol.* 85, 227–234. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(99\)00120-x](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(99)00120-x)
- Stenlund, S., Kindahl, H., Ugglå, A., Björkman, C., 2003. A long-term study of *Neospora caninum* infection in a Swedish dairy herd. *Acta Vet. Scand.* 44, 63–71. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-44-63>
- Strohbusch, M., Müller, N., Hemphill, A., Krebber, R., Greif, G., Gottstein, B., 2009. Toltrazuril treatment of congenitally acquired *Neospora caninum* infection in newborn mice. *Parasitol. Res.* 104, 1335–1343. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1328-x>
- Syed-Hussain, S.S., Howe, L., Pomroy, W.E., West, D.M., Hardcastle, M., Williamson, N.B., 2015. Study on the use of toltrazuril to eliminate *Neospora caninum* in congenitally infected lambs born from experimentally infected ewes. *Vet. Parasitol.* 210, 141–144. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.03.019>
- Sykes, J.E., 2014. Chapter 73 - Neosporosis, in: Sykes, J.E. (Ed.), *Canine and Feline Infectious Diseases*. W.B. Saunders, Saint Louis, pp. 704–712. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-0795-3.00073-9>
- Tarantino, C., Rossi, G., Kramer, L.H., Perrucci, S., Cringoli, G., Macchioni, G., 2001. *Leishmania infantum* and *Neospora caninum* simultaneous skin infection in a young dog in Italy. *Vet. Parasitol.* 102, 77–83. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(01\)00518-0](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(01)00518-0)
- Thompson, G., Canada, N., do Carmo Topa, M., Silva, E., Vaz, F., Rocha, A., 2001. First confirmed case of *Neospora caninum*-associated abortion outbreak in Portugal. *Reprod. Domest. Anim. Zuchthyg.* 36, 309–312. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2001.00307.x>



- Thurmond, M.C., Anderson, M.L., Blanchard, P.C., 1995. Secular and seasonal trends of *Neospora* abortion in California dairy cows. *J. Parasitol.* 81, 364–367.
- Thurmond, M.C., Branscum, A.J., Johnson, W.O., Bedrick, E.J., Hanson, T.E., 2005. Predicting the probability of abortion in dairy cows: a hierarchical Bayesian logistic-survival model using sequential pregnancy data. *Prev. Vet. Med.* 68, 223–239. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2005.01.008>
- Thurmond, M.C., Hietala, S.K., 1997a. Effect of congenitally acquired *Neospora caninum* infection on risk of abortion and subsequent abortions in dairy cattle. *Am. J. Vet. Res.* 58, 1381–1385.
- Thurmond, M.C., Hietala, S.K., 1997b. Effect of *Neospora caninum* infection on milk production in first-lactation dairy cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 210, 672–674.
- Thurmond, M.C., Hietala, S.K., 1996. Culling associated with *Neospora caninum* infection in dairy cows. *Am. J. Vet. Res.* 57, 1559–1562.
- Thurmond, M.C., Hietala, S.K., Blanchard, P.C., 1997. Herd-based diagnosis of *Neospora caninum*-induced endemic and epidemic abortion in cows and evidence for congenital and postnatal transmission. *J. Vet. Diagn. Investig. Off. Publ. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagn. Inc* 9, 44–49. <https://doi.org/10.1177/104063879700900108>
- Tirosh-Levy, S., Savitsky, I., Blinder, E., Mazuz, M.L., 2022. The involvement of protozoan parasites in sheep abortions - A ten-year review of diagnostic results. *Vet. Parasitol.* 303, 109664. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2022.109664>
- Tranas, J., Heinzen, R.A., Weiss, L.M., McAllister, M.M., 1999. Serological evidence of human infection with the protozoan *Neospora caninum*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 6, 765–767. <https://doi.org/10.1128/CDLI.6.5.765-767.1999>
- Trees, A.J., Davison, H.C., Innes, E.A., Wastling, J.M., 1999. Towards evaluating the economic impact of bovine neosporosis. *Int. J. Parasitol.* 29, 1195–1200. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(99\)00093-4](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(99)00093-4)
- Trees, A.J., Guy, F., Tennant, B.J., Balfour, A.H., Dubey, J.P., 1993. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in a population of urban dogs in England. *Vet. Rec.* 132, 125–126. <https://doi.org/10.1136/vr.132.6.125>
- Trees, A.J., McAllister, M.M., Guy, C.S., McGarry, J.W., Smith, R.F., Williams, D.J.L., 2002. *Neospora caninum*: oocyst challenge of pregnant cows. *Vet. Parasitol.* 109, 147–154. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(02\)00234-0](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(02)00234-0)
- Trees, A.J., Williams, D.J.L., 2005. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Trends Parasitol.* 21, 558–561. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.09.005>
- Uesaka, K., Koyama, K., Horiuchi, N., Kobayashi, Y., Nishikawa, Y., Inokuma, H., 2018. A clinical case of neosporosis in a 4-week-old holstein friesian calf which developed hindlimb paresis postnatally. *J. Vet. Med. Sci.* 80, 280–283. <https://doi.org/10.1292/jvms.17-0205>
- Uggla, A., Stenlund, S., Holmdahl, O.J., Jakubek, E.B., Thebo, P., Kindahl, H., Björkman, C., 1998. Oral *Neospora caninum* inoculation of neonatal calves. *Int. J. Parasitol.* 28, 1467–1472. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(98\)00110-6](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(98)00110-6)
- UNICOL – Cooperativa Agrícola, C.R.L., 2022. A UNICOL • UNICOL [WWW Document]. UNICOL. URL <https://www.unicol.pt/a-unicol/> (accessed 3.16.22).
- van Maanen, C., Wouda, W., Schares, G., von Blumröder, D., Conraths, F.J., Norton, R., Williams, D.J.L., Esteban-Redondo, I., Innes, E.A., Mattsson, J.G., Björkman, C., Fernández-García, A., Ortega-Mora, L.M., Müller, N., Sager, H., Hemphill, A., 2004. An interlaboratory comparison of immunohistochemistry and PCR methods for detection of *Neospora caninum* in bovine foetal tissues. *Vet. Parasitol.* 126, 351–364. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.08.016>

- Varcasia, A., Capelli, G., Ruiu, A., Ladu, M., Scala, A., Bjorkman, C., 2006. Prevalence of *Neospora caninum* infection in Sardinian dairy farms (Italy) detected by iscom ELISA on tank bulk milk. *Parasitol. Res.* 98, 264–267. <https://doi.org/10.1007/s00436-005-0044-4>
- Venturini, M.C., Venturini, L., Bacigalupe, D., Machuca, M., Echaide, I., Basso, W., Unzaga, J.M., Di Lorenzo, C., Guglielmone, A., Jenkins, M.C., Dubey, J.P., 1999. *Neospora caninum* infections in bovine fetuses and dairy cows with abortions in Argentina. *Int. J. Parasitol.* 29, 1705–1708. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(99\)00143-5](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(99)00143-5)
- von Blumröder, D., Schares, G., Norton, R., Williams, D.J.L., Esteban-Redondo, I., Wright, S., Björkman, C., Frössling, J., Risco-Castillo, V., Fernández-García, A., Ortega-Mora, L.M., Sager, H., Hemphill, A., van Maanen, C., Wouda, W., Conraths, F.J., 2004. Comparison and standardisation of serological methods for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in bovines. *Vet. Parasitol.* 120, 11–22. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.12.010>
- Waap, H., Nunes, T., Vaz, Y., Leitão, A., 2017. Serological study of *Neospora caninum* in dogs and wildlife in a nature conservation area in southern Portugal. *Parasitol. Open* 3. <https://doi.org/10.1017/pao.2017.8>
- Waap, H., Volkart de Oliveira, U., Nunes, T., Gomes, J., Gomes, T., Bärwald, A., Dias Munhoz, A., Schares, G., 2020. Serological survey of *Neospora* spp. and *Besnoitia* spp. in horses in Portugal. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Rep.* 20, 100391. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2020.100391>
- Waldner, C.L., 2005. Serological status for *N. caninum*, bovine viral diarrhoea virus, and infectious bovine rhinotracheitis virus at pregnancy testing and reproductive performance in beef herds. *Anim. Reprod. Sci.* 90, 219–242. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.03.017>
- Waldner, C.L., Henderson, J., Wu, J.T., Breker, K., Chow, E.Y., 2001. Reproductive performance of a cow-calf herd following a *Neospora caninum*-associated abortion epidemic. *Can. Vet. J. Rev. Veterinaire Can.* 42, 355–360.
- Waldner, C.L., Janzen, E.D., Henderson, J., Haines, D.M., 1999. Outbreak of abortion associated with *Neospora caninum* infection in a beef herd. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 215, 1485–1490, 1448–1449.
- Waldner, C.L., Janzen, E.D., Ribble, C.S., 1998. Determination of the association between *Neospora caninum* infection and reproductive performance in beef herds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 213, 685–690.
- Wang, S., Yao, Z., Zhang, N., Wang, D., Ma, J., Liu, S., Zheng, B., Zhang, B., Liu, K., Zhang, H., 2016. Serological study of *Neospora caninum* infection in dogs in central China. *Parasite* 23, 25. <https://doi.org/10.1051/parasite/2016025>
- Weston, J.F., Heuer, C., Williamson, N.B., 2012. Efficacy of a *Neospora caninum* killed tachyzoite vaccine in preventing abortion and vertical transmission in dairy cattle. *Prev. Vet. Med.* 103, 136–144. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2011.08.010>
- Weston, J.F., Williamson, N.B., Pomroy, W.E., 2005. Associations between pregnancy outcome and serological response to *Neospora caninum* among a group of dairy heifers. *N. Z. Vet. J.* 53, 142–148. <https://doi.org/10.1080/00480169.2005.36492>
- Williams, D.J., Davison, H.C., Helmick, B., McGarry, J., Guy, F., Otter, A., Trees, A.J., 1999. Evaluation of a commercial ELISA for detecting serum antibody to *Neospora caninum* in cattle. *Vet. Rec.* 145, 571–575. <https://doi.org/10.1136/vr.145.20.571>
- Williams, D.J., Guy, C.S., McGarry, J.W., Guy, F., Tasker, L., Smith, R.F., MacEachern, K., Cripps, P.J., Kelly, D.F., Trees, A.J., 2000. *Neospora caninum*-associated abortion in cattle: the time of experimentally-induced parasitaemia during gestation determines foetal

- survival. *Parasitology* 121 ( Pt 4), 347–358.  
<https://doi.org/10.1017/s0031182099006587>
- Williams, D.J., McGarry, J., Guy, F., Barber, J., Trees, A.J., 1997. Novel ELISA for detection of *Neospora*-specific antibodies in cattle. *Vet. Rec.* 140, 328–331.  
<https://doi.org/10.1136/vr.140.13.328>
- Williams, D.J.L., Guy, C.S., Smith, R.F., Ellis, J., Björkman, C., Reichel, M.P., Trees, A.J., 2007. Immunization of cattle with live tachyzoites of *Neospora caninum* confers protection against fetal death. *Infect. Immun.* 75, 1343–1348. <https://doi.org/10.1128/IAI.00777-06>
- Williams, D.J.L., Hartley, C.S., Björkman, C., Trees, A.J., 2009. Endogenous and exogenous transplacental transmission of *Neospora caninum* - how the route of transmission impacts on epidemiology and control of disease. *Parasitology* 136, 1895–1900.  
<https://doi.org/10.1017/S0031182009990588>
- Winzer, P., Müller, J., Aguado-Martínez, A., Rahman, M., Balmer, V., Manser, V., Ortega-Mora, L.M., Ojo, K.K., Fan, E., Maly, D.J., Van Voorhis, W.C., Hemphill, A., 2015. In Vitro and In Vivo Effects of the Bumped Kinase Inhibitor 1294 in the Related Cyst-Forming Apicomplexans *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 6361–6374. <https://doi.org/10.1128/AAC.01236-15>
- Wouda, W., Bartels, C.J.M., Moen, A.R., 1999a. Characteristics of *neosporea caninum*-associated abortion storms in dairy herds in The Netherlands (1995 to 1997). *Theriogenology* 52, 233–245. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00125-9](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00125-9)
- Wouda, W., Brinkhof, J., van Maanen, C., de Gee, A.L.W., Moen, A.R., 1998a. Serodiagnosis of Neosporosis in Individual Cows and Dairy Herds: A Comparative Study of Three Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 5, 711–716.
- Wouda, W., Dijkstra, T., Kramer, A.M., van Maanen, C., Brinkhof, J.M., 1999b. Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infections in dogs and cattle. *Int. J. Parasitol.* 29, 1677–1682. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(99\)00105-8](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(99)00105-8)
- Wouda, W., Dubey, J.P., Jenkins, M.C., 1997a. Serological diagnosis of bovine fetal neosporosis. *J. Parasitol.* 83, 545–547.
- Wouda, W., Moen, A.R., Schukken, Y.H., 1998b. Abortion risk in progeny of cows after a *Neospora caninum* epidemic. *Theriogenology* 49, 1311–1316.  
[https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(98\)00078-8](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00078-8)
- Wouda, W., Moen, A.R., Visser, I.J., van Knapen, F., 1997b. Bovine fetal neosporosis: a comparison of epizootic and sporadic abortion cases and different age classes with regard to lesion severity and immunohistochemical identification of organisms in brain, heart, and liver. *J. Vet. Diagn. Investig. Off. Publ. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagn. Inc* 9, 180–185. <https://doi.org/10.1177/104063879700900212>
- Yaeger, M.J., Shawd-Wessels, S., Leslie-Steen, P., 1994. *Neospora* abortion storm in a midwestern dairy. *J. Vet. Diagn. Investig. Off. Publ. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagn. Inc* 6, 506–508. <https://doi.org/10.1177/104063879400600424>

## Anexos

**Anexo 1** – Quadro resumo dos fatores de risco a ocorrência de infecção e de aborto por *N. caninum*. Adaptado de Dubey et al., (2007).

Fatores de Risco	Para a Infecção por <i>N. caninum</i>		Para a aborto por <i>N. caninum</i>	
	Fator de Risco	Fator de Proteção	Fator de Risco	Fator de Proteção
	<b>Anticorpos anti-<i>N. caninum</i> :</b>			
Seropositividade individual	N.A.	N.A.	+	
Níveis de anticorpos anti- <i>N. caninum</i> em bovinos individualmente	N.A.	N.A.	+	
Prevalência na manada	N.A.	N.A.	+	
<b>Idade, paridade, nº da gestação e nº da lactação:</b>				
Idade dos bovinos	+	-		
Média de idades das vacas	+			
Proporção de novilhas		-		
Novilhas e vacas adultas / vitelos	+			
Nº da Gestação	+			
Paridade			+	
Nº da Lactação				-
<b>Hospedeiros definitivos (cães e outros canídeos):</b>				
<b>-Cães:</b>				
Presença de cães na exploração	+	-		
Presença de cães na exploração nos últimos 10 anos	+			
Nº de cães na exploração	+		+	
<b>-Comportamento dos cães:</b>				
Defecam na manjedoura/corredor de alimentação	+			
Defecam na pastagem ou nos locais de armazenamento da silagem	+			
Consumo de placentas, descargas uterinas, colostro ou leite	+		+	
Frequência de defecação na manjedoura			+	
Densidade de cães no distrito ou município	+			
<b>Outros canídeos hospedeiros definitivos:</b>				
Abundância na região da exploração	+			
Frequência de observação nas instalações da exploração				-
<b>-Gatos:</b>				
Presença de gatos		-		
Observação de gatos vadios				-
<b>Outros hospedeiros intermediários:</b>				
<b>-Outras espécies animais:</b>				
Presença de coelhos e/ou cães	+			
Presença de aves e/ou cães				
Nº de aves >10			+	
Presença de cavalos			+	
<b>-Contacto com animais doentes:</b>				
Uso de maternidades para alojar animais doentes			+	

<b>Pastoreio e Forragens:</b>				
Alimentação com silagem de milho com bolor durante o verão			+	
Fornecer restos de silagem às novilhas durante o verão			+	
Ausência de pastoreio	+			
Pastoreio durante o verão		-		
Uso de manjedouras fixas para fornecimento de feno	+			
Uso de dispensadores fixos de concentrado		-		
Contacto de animais selvagens com o concentrado do desmame	+			
<b>-Fonte de água para abeberamento:</b>				
Lagoa e poço ou rede pública	+			
<b>-Colostro ou leite:</b>				
Alimentação dos vitelos com recurso ao colostro misturado	+			
<b>-Época de partos:</b>				
Partos na primavera ou partos no outono	+			
Época de partos > 3 meses		-		
<b>-Densidade animal:</b>				
Encabeçamento bovino	+			
Encabeçamento bovino durante o inverno	+			
Área da exploração		-		
Tamanho da manada	+			
Grandes manadas	+			
<b>-Origem das novilhas de substituição:</b>				
Criação das novilhas de substituição na própria exploração	+			
Novilhas provenientes de explorações negativas		-		
Carácter maternal			+	
<b>-Raça:</b>				
Raça das vacas		-		
Inseminar bovinos de leite com sémen de carne				-
<b>-Problemas reprodutivos:</b>				
História de aborto em animais infetados congenitamente			+	
Taxa de retorno ao cio após gestação confirmada			+	
Taxa de retenção de membranas fetais			+	
Prevalência de retenção de membranas fetais em anos anteriores > 10%			+	
<b>-Tipo de alojamento:</b>				
Estabulação fixa vs. Estabulação livre	+			
Estabulação livre			+	
Novilhas alojadas em grupo				-
<b>-Fatores demográficos:</b>				
População humana	+			
Proximidade com cidades ou vilas			+	
<b>-Clima:</b>				
Temperatura média em julho (verão, Alemanha)	+			
Temperatura média na primavera (Itália)	+			
Chuva			+	
<b>-Estação do Ano:</b>				
Verão (Holanda)			+	
Inverno (Califórnia)			+	



### Anexo 3 – Inquérito realizado aos produtores:



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

## Inquérito Epidemiológico – Neosporose Bovina

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária



#### Identificação da Exploração:

Nome: \_\_\_\_\_

Morada: \_\_\_\_\_ Código Postal \_\_\_\_\_

Contactos: \_\_\_\_\_

#### Caracterização da Exploração:

1. Quantas vacas existem na exploração? \_\_\_\_\_

1.2. Quantas se encontram em lactação? \_\_\_\_\_

2. Quantas novilhas existem na exploração? \_\_\_\_\_

3. Realizam quantas ordenhas?

1    2    3

3.1. Sistema de Ordenha?

Sala de Ordenha/Cabanão    Máquina de Ordenha

4. Tipo de Exploração:

Estabulação Permanente    Semi-Estabulação    Pastoreio Permanente

4.1. Local de alimentação:

Pastagem    Manjedoura    Misto (Pastagem + Manjedoura)

4.2. Tipo de infraestruturas associadas:

Estábulo    Parque de Alimentação (coberto ou descoberto)    Nada

5. Tipo de Beneficiação:

Cobrição Natural    I. Artificial    Regime Misto

6. Tem cães presentes na exploração, dos quais são detentores?

Sim    Não   Quantos? \_\_\_\_\_

6.1. **Se Sim**, estes têm acesso às manjedouras, pastagens/parques, locais de armazenamento dos alimentos ou maternidades?

Sim    Não

6.1.1 Estão sempre presos?

Sim    Não

6.2. Existem outros cães (cães vadios ou de vizinhos) que possam ter acesso às suas pastagens, parques, manjedouras, locais de armazenamento dos alimentos ou maternidades?

Sim    Não

7. Já ouviu falar em Neosporose Bovina?

Sim  Não

6.1. **Se Sim**, tem ideia da origem da doença ou como ocorre a disseminação do agente responsável pela mesma?

Sim  Não

8. Teve abortos no último ano?

Sim  Não  Não sei

8.1. **Se Sim**, quantos? \_\_\_\_\_

9. Local de Parto dos Animais:

A Campo  Maternidade

10. Como é o manejo dos abortos e anexos fetais?

Enterram  Incineram  Fornecem ao cão  Deixam no pasto  Outro \_\_\_\_\_

**Parâmetros Reprodutivos:**

1. Nº Médio de Lactações \_\_\_\_\_

2. Intervalo entre partos \_\_\_\_\_

3. Nº de IA/gestação \_\_\_\_\_

**Consentimento do produtor:**

Tendo em conta a informação fornecida, eu, \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_, detentor do número de identificação fiscal \_\_\_\_\_ em  
representação da exploração \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_, com a marca da exploração \_\_\_\_\_ autorizo a utilização

dos seguintes dados na dissertação de mestrado de Pedro Faria:

Imagens fotográficas

Dados Reprodutivos

Inquérito

Assinatura: \_\_\_\_\_, no dia \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_\_.



## Anexo 4 – Protocolo laboratorial para pesquisa de anticorpos anti-Neospora caninum em soro bovino:

### Interpretation of results from individual serum sample:

IRPC VALUE	NEOSPORA CANINUM ANTIBODY STATUS
Less than or equal to 6,0	NEGATIVE
Greater than 6,0 and less or equal to 10,0	SUSPECT
Greater than 10,0	POSITIVE

### Interpretation of results from individual milk sample:

IRPC VALUE	NEOSPORA CANINUM ANTIBODY STATUS
Less than or equal to 4,74	NEGATIVE
Greater than 4,74	POSITIVE

### Interpretation of results from tank of milk sample:

IRPC Value	Prevalence of antibodies against <i>N. caninum</i> in the animals furnishing milk to the tank*
Less than or equal to 3,0	Less to 5-10%
Greater than 3,0	Higher than 10%

\*As the volume of milk that each cow is furnishing to the tank is variable, the prevalence value obtained from the tank of milk sample has to be considered as a guiding result.

### TEST DEVELOPMENT

	SERUM	MILK
1.	1/100 - 50 µl/well	Undiluted - 100 µl/well
2.	+37 °C - 1 hour	+4 °C - Overnight
3.	3 times	
4.	Conjugate Solution (50 µl/well)	
5.	+37 °C - 1 hour	
6.	3 times	
7.	Substrate Solution (50 µl/well)	
8.	Room temperature - 15 minutes	
9.	Stop Solution (50 µl/well)	
10.	405 nm	

**CIVTEST**



LABORATORIOS HIPRA, S.A. Avda. la Seda, 135 - 17170 Amer (Girona) Spain  
Tel. (34) 972 43 05 60, Fax (34) 972 43 05 61, hipra@hipra.com

700545-01.1

03-16

### PRINCIPLE OF TEST

The CIVTEST<sup>®</sup>BOVIS NEOSPORA is an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The specific antigen of *Neospora caninum* is coated on 96 well plates. Upon incubation of the sample in the test well, antibodies specific to *Neospora caninum* binds with the coated antigen and remains in the well after washing off the unbound material; then a conjugated is added that binds any attached bovine antibody. After that, unbound conjugate is washed away and a peroxidase-specific chromogenic substrate is added. The colour appearing in each well is proportional to the amount of bovine antibody specific to *Neospora caninum* present in the diluted sample.

The CIVTEST<sup>®</sup>BOVIS NEOSPORA works either with serum or milk as a sample. The kit allows also the interpretation of results obtained either from an individual milk sample or tank of milk sample. In the parts B and C of the test Procedure section it is described how to use serum or milk as a sample in the assay. In part B of the Reading Results section it is described how to interpret the results in relation to the sample used: individual serum, individual milk or tank of milk.

Moreover, CIVTEST<sup>®</sup>BOVIS NEOSPORA could be also used for the estimation of the avidity of the anti-*N. caninum* IgGs present in bovine serum samples. The avidity allows the differentiation between recent and chronic infections. For the avidity calculation you can ask HIPRA for the supplementary reagent CIVTEST<sup>®</sup>BOVIS NEOSPORA (Avidity Supplement) that allows the calculation of this parameter on the basis of the reagents of the present kit.

### KIT COMPOSITION (ENOUGH FOR 480 TESTS)

PRODUCT	QUANTITY
96-well microplates (in eight-well strips) coated with the specific <i>Neospora caninum</i> antigen.	5
Vial N°1: Washing Solution (x10).	2x100 ml
Vial N°2: Sample Diluent Solution (x3) containing green dye.	100 ml
Vial N°2: Conjugate Solution: Solution of a Monoclonal Antibody against bovine antibodies/HRPO containing red dye. Ready to use.	30 ml
Vial N°3: Substrate solution: ABTS solution. Ready to use.	30 ml
Vial N°4: STOP Solution: Oxalic acid solution. Ready to use.	30 ml
Vial N°5: Positive Control: Positive Control Serum pre-diluted containing yellow dye. Ready to use.	2,2 ml
Vial N°6: Negative Control: Negative Control Serum pre-diluted containing blue dye. Ready to use.	2,2 ml
Microplate adhesive cover.	5
Kit insert.	1
Certificate of analysis.	1

The preservative used in the liquid reagents is a mixture of methylisothiazolone and bronantrodolanone.

### Materials required but not provided.

+37 °C incubator, centrifuge, precision single and/or multichannel pipettes with disposable pipette tips, tubes or dilution plates for diluting samples, 96-well plate reader, distilled or deionised water and plate-washing device.

### PRECAUTIONS FOR USERS

Carefully read this kit insert. Store all reagents between +2 and +8 °C (do not freeze). Undiluted reagents should be stored between +2 and +8 °C sealed inside the plastic bag with silica gel as moisture can damage the plates. Even though the antigen has been inactivated during the manufacturing process, the antigen-coated plates should be treated as a potential source of *Neospora caninum*. Do not expose substrate solution to strong light or any oxidising agents. **ABTS substrates are very sensitive to trace levels of contamination and should not therefore be returned to the bottle once removed.** **Approximately 25% overage is supplied to allow the removal of a little over the exact requirements.** Do not use components past expiry date and do not intermix components from kits with different lot numbers. Careful pipetting and washing throughout the procedure are necessary to maintain precision and accuracy. Do not pipette by mouth. Use gloves during the process. The kit insert is an organic acid, which is toxic, and may be corrosive; handle with care. All waste materials must be properly decontaminated prior to disposal. For veterinary use only. **Unopened reagents, correctly stored, are stable until the expiry date printed in the external label.**

### TEST PROCEDURE

#### A. REAGENT PREPARATION

All reagents must be allowed to come to room temperature before use.

**Washing Solution (x10) (Vial N° 1):** To reconstitute add 1 volume of Washing Solution concentrate to 9 volumes of **distilled or deionised water** (e.g. to prepare 200 ml of reconstituted Washing Solution, mix 20 ml of the concentrate solution with 180 ml of **distilled or deionised water**). We recommend that this should be used within 7 days.

## CIVTEST<sup>®</sup>BOVIS NEOSPORA

Detection and quantification of specific antibodies against tachyzoites of *Neospora caninum*, by indirect ELISA



**Sample Diluent Solution (x3) (Vial N° 1):** To reconstitute add 1 volume of Sample Diluent Solution concentrate to 2 volumes of **distilled or deionised water** (e.g. to prepare 60 ml of reconstituted Sample Diluent Solution, mix 20 ml of the concentrate solution with 40 ml of **distilled or deionised water**). We recommend that this should be used within 7 days.

**NOTE:** Crystals may form in the washing and sample diluent solutions due to the high concentration of salts. If reconstituting the whole volume, the bottle should simply be repeatedly inverted prior to the reconstitution step. If reconstituting only a proportion of the volume, the crystals should first be allowed to re-dissolve at room temperature or in a +28 – +37 °C water bath for 10–15 minutes. To avoid crystal formation in this concentrated 10x washing solution it can be stored at room temperature after the first precipitated resuspension.

#### B. SAMPLE PREPARATION

**Positive and negative controls are ready to use and do not require dilution.**

The **serum samples** must be diluted 1/100 in reconstituted Sample Diluent Solution. If round bottomed 96-well plates (dilatation plates) are available together with multi-channel 10 µl pipettes the following **3-step dilution protocol** is recommended: first dilute 10 µl of sample in 190 µl of reconstituted Sample Diluent Solution pipetting each sample in the dilution plate, and then transfer 10 µl of this 1/20 diluted sample to the ELISA well into which has previously been pipetted 40 µl of reconstituted Sample Diluent Solution. **The milk samples** (either individual or tank of milk samples) must be skimmed before used in the kit. A suitable protocol to eliminate the cream from the whole milk could be to centrifuge the sample at 1000 xg for 5 min +4 °C. After the centrifugation 3 different layers appear in the tube: an upper creamy layer, a middle layer corresponding to the serum and usually a white pellet also appear in the bottom of the tube (the thickness of each layer is very variable from sample to sample), the part that has to be drawn for the assay is the one corresponding to the milk serum below the cream layer. The creamy layer has to be crossed with the pipet to draw the serum sample avoiding the contamination either with the cream or with the material from the white pellet. Once skimmed the samples are assayed undiluted. It must be avoided freezing the whole milk samples. If the equipment needed for the skimming protocol is not available, in the sampling place it is preferable to collect the samples in tubes containing a preservative and sending the samples to the lab at +4 °C. A sample collected in correct conditions with preservative could be stored up to one week at +4 °C before to be analysed. Once skimmed the samples could be stored frozen at -20 °C.

#### C. TEST DEVELOPMENT

A. Allow the reagents to come to room temperature and ensure adequate mixing by swirling or inversion.

B. Place sample and control locations on a 12x8 template sheet. The positive and negative controls must always be run in duplicate.

C. Remove the adhesive cover from the plate and add 50 µl of controls to the appropriate wells.

• Individual Serum: Add 50 µl of the 1/100 diluted samples to the appropriate wells.

• Milk Samples: Add 100 µl of the undiluted samples to the appropriate wells.

D. Cover the plate with the adhesive cover and incubate:

• Individual Serum: **60 minutes at +37 °C.**

• Milk Samples: **overnight (aprox. 16 hours) at +4 °C.**

E. Remove the adhesive cover and wash the plate 3 times with reconstituted Washing Solution (300 µl per well).

F. Tap dry as above.

G. Add 50 µl of Conjugate Solution (Vial N° 2) to each well.

H. Cover the plate with the adhesive cover and incubate **60 minutes at +37 °C.**

I. Remove the adhesive cover and wash the plate 3 times with reconstituted Washing Solution (300 µl per well).

J. Tap dry as above.

K. Add 50 µl of Substrate Solution (Vial N° 3) to each well. Shake gently the plate for 2 seconds.

L. Develop the chromogenic reaction for 15 minutes at room temperature (+20 – +25 °C) in the dark.

M. Add 50 µl of Stop Solution (Vial N° 4) to each well. Mix by gently tapping the side of the plate.

N. Wipe the under-surface of the plate free of dust etc. with a soft tissue. Read the plate using a Microtiter Plate Reader at 405 nm having first blanked on air. Record the results.

### READING RESULTS

#### A. TEST VALIDATION

The test is valid if the mean OD<sub>405</sub> of the Positive Control is  $> 0.9$  and ratio (mean OD<sub>405</sub> of the Positive Control / mean OD<sub>405</sub> of the Negative Control) is  $> 5.0$ .

#### B. INTERPRETATION OF RESULTS

For the interpretation of results, an IRPC (Relative Index x100) value is required. The following formula is applied to obtain the IRPC value (using mean OD<sub>405</sub> values obtained for controls).

$$\text{IRPC} = \left[ \frac{\text{OD}_{405} \text{ Sample} - \text{Mean OD}_{405} \text{ Negative Control}}{\text{Mean OD}_{405} \text{ Positive Control} - \text{Mean OD}_{405} \text{ Negative Control}} \right] \times 100$$

**CIVTEST<sup>®</sup>BOVIS NEOSPORA**

**Anexo 5** - Protocolo laboratorial utilizado para pesquisa de anticorpos anti-*Neospora caninum* em soro canino pela técnica de IFAT:

- 1º - Diluir os controlos positivos e negativos em PBS numa diluição 1/25;
- 2º - Diluir os soros a analisar em PBS em diluições 1/25 e 1/50;
- 3ª – Aplicação em cada poço da lâmina que contém o antigénio fixado e permeabilizado de *N. caninum*;
- 4º - Incubar a 37°C durante 45 minutos;
- 5º - Lavar três vezes com PBS;
- 6º - Aplicar o segundo anticorpo marcado com FITC (AbD Serotec® AA132F, ovino anti-cão IgG FITC, lote 160210) numa diluição 1/50 em PBS em cada poço;
- 7º - Incubar a 37°C durante 45 minutos;
- 8º - Lavar cinco vezes com PBS;
- 9º - Aplicar líquido de montagem (pH a 9,4) e uma lamela grande;
- 10º - Observar ao microscópio de fluorescência (objetiva de 40x)

Constituição da solução tampão (PBS):

- 58 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 17 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 68 mM NaCl
- pH = 7,3-7,4

**Anexo 6** – Resumo submetido para apresentação no congresso ApicoWplexa, a realizar nos dias 5,6 e 7 de outubro de 2022:

### **Difficulties in the control of bovine neosporosis in Terceira Island, Azores, Portugal**

In Terceira, one of the 9 islands belonging to the archipelago of Azores, milk production represents 25% the total income, therefore, any aspect affecting reproduction efficacy impacts dramatically on health and the economy. With the present – and first - serological survey (ELISA) for *Neospora caninum*, an overall prevalence of 14.83% was identified in dairy cattle, with animals in 62,43% of farms testing positive. IFAT showed that the prevalence of infected dogs living in farms was 64.52%, while only 8.33% of dogs from urban areas were infected. Thus, there is a higher risk of infection in farm dogs compared to urban dogs ( $p=1,419 \times 10^{-9}$ ). The type of feeding place ( $p=0,01139$ ) and the type of associated infrastructure ( $p=0,006303$ ), also had a positive association with the presence of dogs infected with this agent. In the present work, more than proposing solutions, we focus on the most important difficulties in controlling the spread of *N. caninum* in dairy cattle and dogs in Terceira Island. Almost all dairy production is based on free ranging cattle on green fields. The delivery of a newborn calf mostly is happening in the grass pens, thus, fetal membranes are not removed, both because they are not readily found and, because farmers do not recognize it as an important health management measure. Also, an obstacle to control the spread *N. caninum* is the fact that, there are no physical barriers capable of preventing dogs from free-roaming between farms and terrains, and they can access water sources and food storage places, Stray dogs are a problem. There is, as well, a great need for professional qualification and raising awareness among producers on the impact that neosporosis exerts on the productivity of a farm, both dairy and beef cattle, and the risks involved in dogs having unrestricted access to any area. Concerning the dogs from urban areas, feeding of cattle raw meat is widely accepted, and increases the prevalence of infected and diseased dogs. The implementation of control measures for neosporosis in Terceira is necessary and is dependent on a higher level of changes in the management system, with promoting the land consolidation as one of the factors, for the improvement of dairy health management.