JOÃO PAULO GASPAR CAMPOS

ESTUDO PROSPETIVO DA VARIAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-*NEOSPORA CANINUM* EM VACAS LEITEIRAS

Orientadora: Prof.ª Doutora Sofia Van Harten
Co-orientador: Professor João Paisana

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2020

JOÃO PAULO GASPAR CAMPOS

ESTUDO PROSPETIVO DA VARIAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-*NEOSPORA CANINUM* EM VACAS LEITEIRAS

Dissertação defendida em provas públicas para a obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária no curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, no dia 19 de Março de 2020, com o despacho Reitoral nº. 89/2020, com a seguinte composição de júri:
Presidente: Prof.ª Doutora Laurentina Pedroso
Arguente: Prof.ª Doutora Helga Waap
Orientadora: Prof.ª Doutora Sofia Van Harten

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2020

"A persistência é o menor caminho do êxito."
Charles Chaplin

Agradecimentos

À Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, na pessoa da sua Diretora, Professora Doutora Laurentina Pedroso, pela possibilidade de realização desta Dissertação de Mestrado.

A todos os docentes da desta instituição, especialmente aos que conseguem transmitir a paixão pela sua área aos futuros colegas, por todos os conhecimentos transmitidos, experiência e apoio ao longo do curso.

Um agradecimento especial à Professora Doutora Sofia Van Harten, minha orientadora, por toda a sua disponibilidade e cooperação na redação desta dissertação.

Ao Doutor João Paisana, co-orientador deste trabalho, pelo seu contributo nesta dissertação.

À Doutora Raquel por ter ajudado com o tratamento estatístico deste trabalho.

Ao INIAV por me ter gentilmente cedido o espaço, de modo a poder pôr em prática este estudo, e em especial aos colaboradores do departamento de parasitologia por me terem acompanhado.

Um agradecimento muito especial à exploração Casal de Quintanelas, pela oportunidade e possibilidade de realização deste estudo, por toda a informação disponibilizada e também aos seus colaboradores pelo auxílio na recolha das amostras.

Aos meus pais, por me terem possibilitado todas as condições para que frequentasse e completasse com êxito esta etapa, e por todos os sacrifícios para que tal acontecesse.

Aos meus irmãos e a todos os meus colegas que se tornaram amigos por estarem sempre presentes em todos os momentos em que mais precisei e me terem acompanhado neste percurso tão importante.

Por fim, um profundo agradecimento à Marta, por ter aparecido na minha vida numa altura tão turbulenta e que em todos os momentos demonstrou que queria fazer parte dela, apoiar-me incondicionalmente, e acreditar em mim nestes últimos anos. Obrigada por todos os momentos em que me deste força para conseguir lutar pelos meus objetivos e realizar os meus sonhos.

Resumo

Neospora caninum é um parasita protozoário intracelular obrigatório que causa Neosporose bovina. É uma doença com distribuição mundial associada a abortos, refugo involuntário de animais e diminuição da produção de leite, causando enormes perdas económicas. Pretendeu-se com o presente trabalho determinar a sua prevalência na exploração Casal de Quintanelas de 16 de Junho a 06 de Novembro de 2018, verificar se a entrada ou saída de animais positivos para o tanque de leite se traduzia em alguma alteração no nível de anticorpos no mesmo, se os animais apresentavam diferentes valores nos anticorpos em diferentes fases de produção e se existia uma correlação de positividade entre mães e filhas. Para tal utilizou-se amostras de soro sanguíneo (98 amostras) e leite individual (623 amostras)

ou do tanque (22 amostras) para realizar o teste ELISA CIVTEST® BOVIS NEOSPORA – HIPRA. A prevalência de *Neospora caninum* foi de 27,1% num total de 461 bovinos fêmeas, valor que se encontra próximo ou dentro dos intervalos já estudados anteriormente no nosso país. De 181 vacas analisadas, 21% seroconverteram, tornando-se positivas no final da gestação (valores de IRPC das fases de lactação e secagem negativos, e positivos no parto). Apesar de existir alteração no valor de anticorpos com a entrada ou saída de animais para o tanque de leite, não foi detetada uma associação estatisticamente significativa entre este e a proporção de animais positivos em cada tanque. Verificou-se que maioritariamente a transmissão é vertical pois mais de 50% das mães positivas tiveram filhas positivas. A falta de associação entre a seropositividade de mães e filhas e a existência de filhas positivas de mães negativas indicou-nos que também existiu transmissão horizontal na exploração. Observou-se ainda uma distribuição uniforme de animais seropositivos entre os grupos etários. A frequência relativa de abortos não foi considerada normal (2,6%), devendo ser considerada importante e sendo necessário tomar medidas para a reduzir, tal como a adoção de medidas de prevenção da infeção. A fim de reduzir ou prevenir a Neosporose bovina na exploração, foi aconselhada, sempre que possível, e tendo em conta questões económicas, a aplicação de medidas de prevenção e controle específicas para esta doença.

Palavras-chave: Neosporose bovina, ELISA, soro sanguíneo, leite, aborto

Abstract

Neospora caninum is a mandatory intracellular protozoan parasite that causes Bovine Neosporosis. It is a worldwide disease associated with abortions, involuntary culling of animals and decreased milk production, causing huge economic losses. The aim of this study was to to determine its prevalence in Casal de Quintanelas farm from the 16th of June to the 6th of November 2018, to verify if the entry or exit of positive animals to the milk tank caused any alteration in the level of antibodies in the milk tank, if the animals had different values in the antibodies at different stages of production and whether there was a positive correlation between mothers and daughters. For this, blood serum (98 samples) and individual (623 samples) or tank milk samples (22 samples) were used to perform the ELISA CIVTEST BOVIS NEOSPORA - HIPRA. The prevalence of *Neospora caninum* was 27.1% in a total of 461 female bovines, which is close to or within the ranges previously studied in our country. Of 181 cows analyzed, 21% seroconverted, becoming positive at the end of gestation (negative lactation and drying phase IRPC values and positive at calving). Although there was a change in the antibodies value with the entry or exit of animals to the milk tank, a statistically significant association between this and the proportion of positive animals in each tank was not detected. It was observed that the transmission is mostly vertical because more than 50% of positive mothers had positive daughters. The lack of association between mothers and daughters' status and the existence of positive daughters from negative mothers indicated that there was also horizontal transmission on the farm. A uniform distribution of seropositive animals among age groups was also observed. The relative frequency of abortions was not considered normal (2,6%) and should be considered important and measures to reduce it should be taken, such as the adoption of infection preventive measures. In order to reduce or prevent bovine neosporosis on the farm, it was advised, whenever possible, and taking into account economic issues, the application of specific prevention and control measures for this disease.

Keywords: Bovine Neosporosis, blood serum, milk, abortion

Lista de Abreviaturas

BVDV – Vírus da diarreia viral bovina (do Inglês, *Bovine viral diarrhea virus*)

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DO – Densidade ótica

ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática

FMVZ – UNESP – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista

HD – Hospedeiro definitivo

HI – Hospedeiro intermediário

IFI – Imunofluorescência indireta

IFN – Interferão

Ig – Imunoglobulina

IL – Interleucina

INIAV – Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária

IRPC – Índice Relativo x 100 (do Inglês, *Relative Índex Per Cent)*

mL – mililitros

mm – milímetros

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro

PCR – Reação da cadeia da polimerase

rpm – Rotações por minuto

UNESP – Universidade Estadual Paulista

μm – micrómetros

~ – Aproximadamente

≤ – Menor ou igual

< – Menor

> – Maior

% – por cento

Índice Geral

Agradecimentos 3
Resumo 4
Abstract 5
Lista de Abreviaturas 6
Índice de Tabelas 9
Índice de Figuras 10
Índice de Gráficos 11
I. DESCRIÇÃO DO ESTÁGIO CURRICULAR 12
1. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista (FMVZ-UNESP) 12
2. Estágio com Serbuvet em Sanidade e Clínica de Grandes Animais 14
II. DISSERTAÇÃO DE MESTRADO 16
1. INTRODUÇÃO 16
1.1 Abortos em bovinos 16
1.1.1 Causas 16
1.1.2 Consequências económicas associadas 17
1.2 Neosporose 17
1.2.1 Etiologia 17
1.2.2 Ciclo de Vida 18
1.2.3. Transmissão 21
1.2.4 Patogenia 23
1.2.5 Sintomatologia 24
1.2.6 Fatores de risco 27
1.2.7 Diagnóstico 30
1.2.8 Tratamento 40
1.2.9 Prevenção e controlo 41
1.2.10 Impacto económico 43
1.3 Objetivos 45
2. MATERIAL E MÉTODOS 46
2.1 Animais e local experimental 46
2.2 Delineamento experimental 46
2.3 Análise estatística 48

3. RESULTADOS 49
3.1 Parâmetros demográficos 49
3.2 Diferenças no IRPC em diferentes fases de produção 49
3.3 Diferenças na frequência relativa de animais positivos nas fases de produção ... 50
3.4 Correlação de mães e filhas 50
3.5 Teste ao tanque de leite 50
3.6 Associação entre o valor IRPC e a proporção de animais positivos no tanque de leite 51
3.7 Correlação da seropositividade com a idade dos animais 52
3.8 Correlação da seropositividade com a ocorrência de aborto 52
4. DISCUSSÃO 54
4.1 Prevalência de Neosporose bovina 54
4.2 Protocolo utilizado 55
4.3 Titulação de anticorpos 56
4.4 *Neospora caninum* no tanque de leite 58
4.5 Correlação de mães e filhas 59
4.6 Via de transmissão 60
4.7 Idade dos animais 60
4.8 Aborto por N. caninum 61
4.9 Controlo da infeção 62
5. CONCLUSÃO 65
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 66

Índice de Tabelas

Tabela 1. Procedimentos realizados durante o estágio curricular na FMVZ-UNESP

Tabela 2. Doenças observadas durante o estágio curricular na FMVZ-UNESP

Tabela 3. Fatores que afetam o risco de infeção bovina por *N. caninum*

Tabela 4. Fatores que afetam o risco de aborto associado a *N. caninum* em bovinos

Tabela 5. Interpretação dos resultados do teste de ELISA

Tabela 6. Frequência absoluta e relativa de amostras de diferentes animais em cada fase de produção

Tabela 7. Análise estatística do valor de IRPC para cada fase de produção

Tabela 8. Análise estatística dos animais positivos para cada fase de produção

Tabela 9. Análise estatística da correlação de seropositividade de mães e filhas

Tabela 10. Dados relativos às amostras semanais do tanque de leite

Tabela 11. Frequência absoluta de vacas de acordo com parâmetros relativos à sua história clínica pregressa

Tabela 12. Prevalência média de *N. caninum* em bovinos de carne e de leite em alguns países

Índice de Figuras

Figura 1: Ciclo de vida de *Neospora caninum*

Figura 2: Ultraestruturas de taquizoíto (A), bradizoíto (B), quisto tecidular (C), oocisto não esporulado (D) e oocisto esporulado (E)

Figura 3. Observação microscópica, sem coloração, de quisto de *N. caninum* presente no cérebro de um gerbil inoculado com amostras de cérebro de bezerro com Neosporose

Figura 4. Produtos da PCR obtidos com diferentes estirpes de *Neospora caninum*.

Figura 5. Imunofluorescência indireta positiva para *N. caninum* em soro de cão

Índice de Gráficos

Gráfico 1. Distribuição de animais positivos e negativos a *N. caninum* de acordo com a sua idade

Gráfico 2. Frequência de abortos e nados mortos em animais positivos e negativos a *N. caninum*

I. DESCRIÇÃO DO ESTÁGIO CURRICULAR

O estágio curricular dividiu-se em duas partes. A primeira foi realizada na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista (UNESP), no Brasil, na área de Medicina de Animais de Produção. A segunda parte realizou-se através da empresa Serbuvet, em Portugal, na área de Medicina Ambulatória de Animais de Produção.

1. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista (FMVZ-UNESP)

A UNESP é uma das maiores e mais importantes universidades brasileiras, com destacada atuação no ensino, na pesquisa e na extensão de serviços à comunidade. Criada em 1976, a partir de institutos isolados de ensino superior que existiam em várias regiões do Estado de São Paulo, esta conta atualmente com 34 unidades, em 24 cidades, ao longo de todo Estado de São Paulo.

Nesta universidade, as faculdades de Medicina Veterinária encontram-se subdivididas em vários departamentos. A FMVZ-UNESP é constituída pelos seguintes departamentos: Cirurgia e Anestesiologia Veterinária, Reprodução Animal, Radiologia Veterinária, Clínica Veterinária, Higiene Veterinária e Saúde Pública. Todos estes funcionam separadamente, apesar de colaborarem em conjunto. O Departamento de Clínica Veterinária divide-se na Clínica de Grandes Animais e na Clínica de Pequenos Animais.

A primeira parte do estágio curricular foi realizado na Clínica de Grandes Animais do Campus de Botucatu da FMVZ-UNESP, entre o dia 04 de setembro de 2017 e 01 de dezembro de 2017.

No geral consistiu em acompanhar consultas, internamentos, exames complementares de diagnóstico e tratamentos aos animais que se apresentaram na Clínica de Grandes Animais durante esse período. Para além disso, foram feitas diversas visitas a explorações próximas para acompanhamento de animais.

Foram adquiridas competências práticas nos diversos procedimentos realizados, competência de lógica diagnóstica, de resposta em emergência, de reconhecimento de sinais clínicos, de comunicação, de trabalho em equipa. Foram adquiridas ainda competências nas seguintes áreas: Semiologia, Fisiologia, Anatomia, Farmacologia, Reprodução, Cirurgia, Medicina interna, Imagiologia, Produção animal, Maneio, Nutrição, Análises laboratoriais e Patologia.

Ao longo de todo o estágio na FMVZ-UNESP, realizaram-se diversos procedimentos que se encontram descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Procedimentos realizados durante o estágio curricular na FMVZ-UNESP

Preparação e administração de medicação (SC, IV, PO, IM, tópica, Colírio)	Colheita de amostras pós-*mortem* para histopatologia e para exame de raiva
Colheita de sangue venoso (V. jugular, V. epigástrica, V. mamária, V. coccígea) e de sangue arterial para hemogasometria	Necropsia
	Sondagem nasogástrica em equinos e orogástrica em ruminantes
Colocação de cateter (V. jugular, V. epigástrica)	Vacinação e desparasitação
Colheita de líquido medular atlanto-occipital	Maneio alimentar
Colheita e análise de líquido ruminal, peritoneal e torácico	Transfaunação
	Ruminotomia
Anamnese e exame físico geral	Lavagem Bronco-alveolar e traqueo-brônquica
Exame neurológico, oftalmológico e oral	Nebulização medicamentosa
Palpação retal	Traqueostomia permanente
Ecografia e ecocardiograma	Realização e remoção de sutura de pele
Radiografia, Ressonância magnética e Tomografia Axial Computorizada	Maneio de cascos
	Desinfeção de umbigo
Endoscopia	Fluidoterapia
Eletrocardiograma e Doppler	Fisioterapia e hidroterapia
Ruminocentese, toracocentese e abdominocentese	Transfusão de sangue e de plasma
Análises bioquímicas e de hemograma	Resolução de estenose prepucial
Análise de coprologia e coprocultura e urianálise	Resolução de prolapso rectal
Esfregaço sanguíneo	Assistência em parto
Teste de luva para diagnóstico de sablose	Contenção de animais
Teste de resistência à insulina	Lavagem do ducto nasolacrimal
Biópsia muscular	Resolução de prolapso uterino
Citologia (PAFF, aposição e raspagem cutânea)	Limpeza diária de feridas de animais com HERDA e de feridas contaminadas
Diagnóstico de gestação por ecografia transretal	
	Maneio de crias recém-nascidas

Durante o estágio no Brasil na faculdade FMV-UNESP houve ainda espaço para melhorar e ganhar confiança na realização de vários tipos de procedimentos clínicos como: abordagem aos pacientes, recolha de amostras para analise, melhorar o raciocínio no diagnostico diferencial e na implementação de diagnostico. A nível da interação com a equipa foi possível aprender a distribuir tarefas, melhorar a comunicação e interação com os colegas. Nesta fase do estágio, houve oportunidade de viver uma realidade da Medicina Veterinária completamente distinta daquela à qual me habituei, ao longo do curso, não só por ter a oportunidade de estagiar num país estrangeiro, onde naturalmente as coisas são feitas de um modo diferente, mas também por estar integrado numa vivência hospitalar, havendo uma abordagem clínica diferente. Na Tabela 2 encontram-se algumas das doenças observadas durante o estágio curricular na FMVZ-UNESP

Tabela 2. Doenças observadas durante o estágio curricular na FMVZ-UNESP

Raiva em diversos bovinos e equinos	Epilepsia em equinos
Desnutrição em diversos bovinos	Arritmia em caprino
Parasitose Gastrointestinal em ovinos	Úlcera da córnea em equinos e ovinos
Tripanossomíase em diversos bovinos de exploração leiteira	Catarata bilateral congénita em caprinos
Enterocolite por sablose em equinos	Torção uterina com peritonite secundária em bovinos gestantes
Síndrome metabólico em *Miniature Mediterranean Donkey*	Pneumonia em suíno, caprino e bovinos jovens
Estenose prepucial em bovinos	Catarata e microftalmia congénita em equino recém-nascido.
Acidose ruminal em bovino de confinamento	Mastite em bovinos leiteiros
HERDA	Cegueira congénita bilateral em bovinos
Fratura de Membro Anterior Esquerdo em caprinos.	Neoplasia ocular em bovinos
Prolapso uterino em equinos	CCE ocular em equinos
Cólica por torção intestinal em equino	Habronemose e pitiose em equinos
Neuromiotonia em equino	Tecido de granulação exuberante em equino
Maceração fetal em equinos	Atonia ruminal em bovinos
Prematuridade em bovinos recém-nascidos	Síndrome da vaca caída em bovinos leiteiros
Urolitíase em caprinos	Carbúnculo sintomático em bovinos
Acidose metabólica em caprinos	Dermatofilose e dermatofitose em equinos
Diarreia crónica em equino	Tétano em equino
Faringite em equino	Prolapso retal em bovinos
Nanismo em diversos *Miniature Horse*	Falha na transferência passiva de imunidade em bovino recém-nascido
Doença de desenvolvimento por deficiência mineral em bovino	Broncopneumonia Bacteriana em equinos
Pleuropneumonia bacteriana por *Streptococcus equi* em equino	Coccidiose em bovino
	Peritonite em equinos
Paraplegia por trauma em bovino	Cólica por sablose e compactação em equino
Artrite séptica em bovino	Sopro cardíaco e arritmias em equinos

2. Estágio com Serbuvet em Sanidade e Clínica de Grandes Animais

A segunda parte do estágio curricular teve a duração de três meses, tendo início no dia 30 de Abril de 2018 e término no dia 30 de Junho de 2018. Este consistiu no acompanhamento do Dr. Dário Alexandre Nunes de Sá Guerreiro, que incorpora a equipa da Serbuvet como médico veterinário de bovinos. A sua atividade estende-se também à prática clínica de pequenos ruminantes, a qual também foi acompanhada durante os referidos meses. Durante o estágio, em sistema de ambulatório, a maioria das explorações visitadas situaram-se na Península de Setúbal, tendo sido também acompanhados outros casos em outras regiões do país.

Neste período foi possível acompanhar procedimentos de diagnóstico e terapêuticos em diversas áreas da prática veterinária de pequenos e grandes ruminantes, nomeadamente a realização de protocolos de sanidade, incluindo desparasitações, vacinação preventiva para a clostridiose, tuberculinização intradérmica pelo teste cervical comparativo, exame serológico para o diagnóstico de brucelose e vacinação das fêmeas negativas, sempre de acordo com o protocolo recomendado pela Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV), por meio

do programa de controlo e erradicação da Brucelose e Tuberculose. Com menor frequência, foi efetuado a vacinação para a Língua Azul.

Relativamente ao sistema reprodutivo, foi possível efetuar palpação retal, acompanhar ecografias retais em efetivos com aptidão leiteira e de carne, para diagnóstico de gestação e auxiliar em partos distócicos e cesarianas. Durante o estágio houve ainda a possibilidade de participar na terapêutica de prolapso uterino, observação de fratura peniana e tratamento de mastite, esta última após o diagnóstico por meio do Teste Californiano de Mastites.

Na área de dermatologia, executei limpeza, tratamento tópico e, quando necessário, encerramento cirúrgico de lesões cutâneas ulcerativas por trauma, bem como drenagem de abcessos. Por outro lado, as doenças que mais frequentemente observei foram sarna sarcótica em pequenos ruminantes e dermatofitose em bovinos.

Dentro das desordens gastrointestinais, tive oportunidade de presenciar e proceder adequadamente em casos de Deslocamento de abomaso, timpanismo espumoso e intussusceção intestinal.

Aplicou-se terapêutica adequada em casos de pneumonia em bovinos após diagnóstico conclusivo.

No que toca às doenças infeciosas, testes rápidos foram utilizados para diagnóstico conclusivo de diarreia neonatal bovina e respetivo tratamento e análise laboratorial para *Neospora caninum* de dois animais. Também houve oportunidade de realizar tratamento bovinos com carbúnculo sintomático e de casos de animais que apresentavam vários graus de evolução de infeção por *Moraxela bovis*.

Adicionalmente, realizaram-se exames de estado geral em pequenos e grandes ruminantes, recolha de amostras sanguíneas, fluidoterapia sistémica e oral e colaborei em procedimentos como colocação de sonda oro-gástrica em caprinos. À parte dos ruminantes, também procedeu à identificação e colocação de micro-chip, vacinações e desparasitações internas e externas de cães presentes nas explorações visitadas e em residências privadas.

II. DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Abortos em bovinos

Aborto em bovinos é definido como o término da gestação entre os 42 e 260 dias de gestação (López-Gatiu *et al.*, 2004).

A ocorrência de mortalidade embrionária e abortos causam enormes prejuízos ao efetivo bovino, aumentando os intervalos entre partos, a idade das primíparas ao primeiro parto, e, por consequência, diminui direta e significativamente os índices de produtividade dos efetivos (Pegoraro *et al.*, 2009).

1.1.1 Causas

Os abortos em bovinos podem ter causas infeciosas e não infeciosas. Dentro das não infeciosas, o aborto pode ocorrer por causas físicas, nutricionais, tóxicas ou genéticas. Quanto às causas físicas, uma vaca pode sofrer aborto por trauma, hipertermia ou ainda por gemelaridade. As deficiências nutricionais como por exemplo de selénio, iodo, vitamina E, vitamina A e β-caroteno podem levar à ocorrência de aborto em bovinos. As causas toxicas incluem o consumo de plantas tóxicas como a cicuta, o cipreste e o zimbro, a ingestão excessiva de agulhas do pinheiro, de *Claviceps purpúrea* (fungo comum do centeio) ou de nitrato/nitrito (proveniente de fertilizantes e algumas plantas). Nestes casos, outros sinais clínicos de intoxicação, como a dispneia grave, espasmos musculares e mucosas hiperémicas, estão geralmente presentes. Anomalias genéticas que resultem em malformações congénitas, discondroplasia (bezerros bulldog) e anormalidades cromossómicas, podem também levar a aborto em bovinos (Cabell, 2007).

Por outro lado, relativamente às causas infeciosas, alguns dos agentes patogénicos agudos mais comuns causadores de abortos em vacas são *Neospora caninum*, Vírus da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (Herpesvírus Tipo 1), Vírus da Diarreia Viral Bovina, diversas espécies de Leptospira e *Brucella abortus* (Baszler *et al.*, 1999; Dubey *et al.*, 2007). *Toxoplasma gondii* e *Sarcocystis cruzi* são outros dois protozoários que devem ser considerados no diagnóstico diferencial do aborto por protozoários em bovinos.

Para o diagnóstico de aborto em bovinos, devem ser realizados exames de diagnóstico

que incluem histopatologia, cultura bacteriana, isolamento de vírus e exame de soro materno para pesquisa de anticorpos. Relativamente a *Neospora caninum (N. caninum)*, a imuno-histoquímica e a deteção de ácido desoxirribonucleico (DNA) do parasita por reação da cadeia da polimerase (PCR) podem ser úteis na sua distinção em relação a outros agentes infeciosos (Dubey, 2003). No entanto, é importante notar que o cálculo de até 20% dos abortos associados a *N. caninum* em bovinos pode ser baseado na exclusão de todas as outras causas de aborto e na observação de lesões e parasitas, em fetos abortados, associados a este parasita (Dubey *et al.*, 2007).

1.1.2 Consequências económicas associadas

O aborto é um grande problema para as explorações pecuárias em todo o Mundo. Mesmo em laboratórios de diagnóstico bem estabelecidos e bem equipados, as causas de mais de 50% dos abortos permanecem sem diagnóstico (Dubey *et al.*, 2007).

Para os produtores de leite, o aborto é provavelmente o mais importante distúrbio reprodutivo sendo que os seus efeitos são maiores se a perda da gestação (aborto) ocorrer entre os 30 e 90 dias (López-Gatiu *et al.*, 2004).

1.2 Neosporose

1.2.1 Etiologia

Neospora caninum é um parasita protozoário intracelular obrigatório, sendo o agente causal da Neosporose em bovinos e bubalinos (Olmo *et al*., 2017). Este parasita pertence ao Filo Apicomplexa, Classe Sporozoasida, Subclasse Coccidiasina, Ordem Eucoccidiorida, Família Sarcocistidae (Cox, 1991; Ellis *et al.,* 1994). Tem dois processos de reprodução, sexuada nos hospedeiros definitivos (HD) e assexuada nos hospedeiros intermediários (HI) (Gunn *et al.,* 2012).

Acredita-se que existam pelo menos duas espécies no género *Neospora: N. caninum* e *N. hughesi* (Atkinson *et al.*, 2000).

N. caninum foi identificado pela primeira vez em cães em 1988 (Dubey *et al.*, 1988). Até lá considera-se que deve ter sido erradamente diagnosticado como *Toxoplasma gondii* (Urquhart *et al*., 1996; Olmo *et al.,* 2017; Macedo *et al*., 2017). Mais tarde foi identificado em bezerros com mieloencefalite (Parish *et al.,* 1987; O´Toole & Jeffrey, 1987; Dubey *et al.*, 2006). Levantamentos realizados em vários países identificaram a infeção por *N. caninum* como a

principal causa de abortos em bovinos, (Anderson *et al.*, 2000) particularmente em bovinos leiteiros e responsável por doença clínica em cães (Dubey & Lindsay, 1996; Macedo *et al*., 2017). Além disso, já foi relatada Neosporose clínica em ovinos, caprinos, cervídeos, rinocerontes e equinos, e anticorpos contra *N. caninum* foram encontrados em soros de búfalos, raposas, coiotes, camelos e felídeos. (Dubey, 2003).

1.2.2 Ciclo de Vida

N. caninum tem um ciclo de vida (Figura 1) heteroxeno facultativo (Goodswen *et al.*, 2013; Marugan-Hernandez, 2017). Durante o seu ciclo de vida, este vai passar por dois processos de reprodução: reprodução sexuada (gametogonia), no HD, e assexuada (esquizogonia), no HI. (Goodswen *et al.*, 2013).

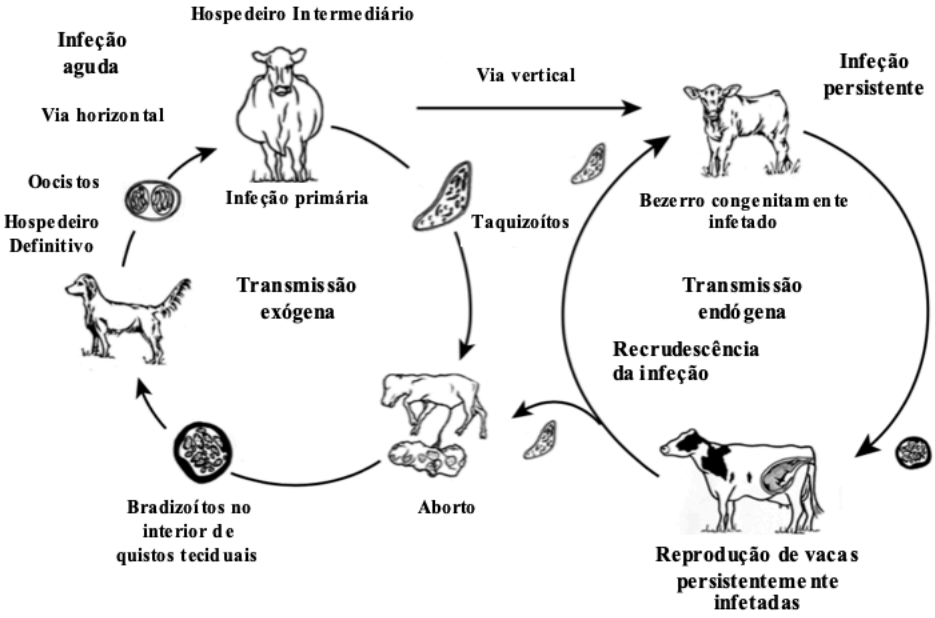


Figura 1: Ciclo de vida de *Neospora caninum* (Adaptado de (Guido *et al.*, 2016))

Como HI de *N. caninum* estão reportados animais domésticos e silvestres, nomeadamente: canídeos, felinos, bovinos, pequenos ruminantes, equinos, cervídeos e bubalinos (Dubey & Lindsay, 1996; Fortunado *et al.*, 2010; Dubey & Schares, 2011; Mansilla & Capozzo, 2017). Também já foram encontrados ratos e ratazanas seropositivos, o que sugere que também podem ter um papel significativo como HI (Dubey, 2003).

Os HD de *N. caninum* mais reconhecidos são canídeos, nomeadamente o cão (*Canis familiaris*), o coiote (*Canis latrans*), o dingo (*Canis lupus dingo*) e, mais recentemente, o lobo

(*Canis lupus*) ((Lindsay D. D., 1999) Gondim *et al.*, 2004; King *et al*., 2010; Dubey *et al*., 2011)).

Para além dos hospedeiros já referidos acima, já foram encontradas evidências serológicas de infeção por *N. caninum* em diversos mamíferos como por exemplo guaxinins. Também foi sugerido que pássaros possam atuar como hospedeiros reservatório para *N. caninum*, não tendo sido ainda provado (Haddad *et al.*, 2005).

O ciclo de vida do *N. caninum* é composto por três fases, de acordo com o seu estádio: taquizoítos, bradizoítos (quistos tecidulares) e oocistos (Figura 2) (Dubey, 2003; Dubey *et al*., 2006; Mansilla & Capozzo, 2017). Os bradizoítos ocorrem no HI, intracelularmente, em quistos tecidulares. Estes são geralmente arredondados ou ovais, e são principalmente encontrados no sistema nervoso central (cérebro e medula espinhal) dos HI, tendo também já sido encontrados no músculo esquelético e retina. (McAllister *et al.*, 1998; Andreotti *et al.*, 2003; Dubey *et al.*, 2006; Mansilla & Capozzo, 2017). Os quistos teciduais podem persistir num hospedeiro infetado durante vários meses ou anos, de forma latente, sem causar manifestações clínicas significativas, até que o sistema imunitário do hospedeiro seja suprimido, permitindo que ocorra recrudescência (Haddad *et al.*, 2005).

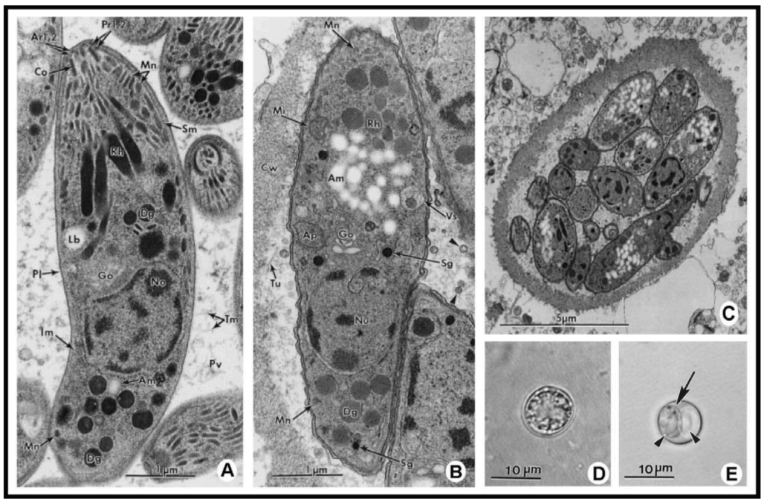


Figura 2: Ultraestruturas de taquizoíto (A), bradizoíto (B), quisto tecidular (C), oocisto não esporulado (D) e oocisto esporulado (E). (Goodswen *et al.*, 2013)

Depois de ingeridos, os quistos libertam os bradizoítos no intestino delgado. Estes invadem as células intestinais, onde se multiplicam por esquizogonia, formando os chamados esquizontes (Marugan-Hernandez, 2017). Após vários ciclos de multiplicação assexuada, (esquizogonia), segue-se uma fase de reprodução sexuada, a gametogonia. A fusão dos gâmetas masculinos e femininos, dá origem aos oocistos.(Marugan-Hernandez, 2017). O HD elimina os

oocistos não esporulados nas fezes durante 5 a 17 dias após a ingestão dos quistos teciduais. Os oocistos, medem aproximadamente 10-12 μm e correspondem à forma de resistência do parasita (McAllister *et al.*, 1998; Dubey, 2003; Mansilla & Capozzo, 2017. Apresentam uma parede robusta, resistente ao congelamento e à secagem, que permite que os esporozoítos sobrevivam num ambiente externo ao hospedeiro por longos períodos de tempo (Dubey *et al.*, 2002). A esporulação (pelo processo de esporogonia) ocorre fora do hospedeiro em apenas 24 horas (Dubey, 2003; Mansilla & Capozzo, 2017), originando oocistos com dois esporocistos, cada um contendo quatro esporozoítos (Lindsay *et al.*, 1999; Dubey *et al.*, 2006).

Especificamente, pouco se sabe sobre a sobrevivência de oocistos de *N. caninum* no meio ambiente, uma vez que são poucos os estudos sobre a avaliação da mesma. Devido à sua estreita relação com *T. gondii*, assume-se que a resistência ambiental dos oocistos de *N. caninum* seja semelhante à dos oocistos de *T. gondii* (Mansilla & Capozzo, 2017). Sabe-se ainda que os animais mais jovens libertam mais oocistos do que os adultos.

A ingestão de oocistos é a única forma de transmissão horizontal demonstrada em herbívoros (Dubey *et al.*, 2007). O oocisto esporulado segue depois todo o trato gastrointestinal do HI. Ao chegar ao intestino, este rompe-se e os esporozoítos migram para o epitélio intestinal, penetrando as células e transformando-se em taquizoítos (Haddad *et al.*, 2005). É nesse local que residem em vacúolos parasitóforos intracelulares e se multiplicam assexuadamente pelo processo de endodiogenia (duas células filhas desenvolvem-se internamente da célula parasitária mãe), até destruírem as células em que se encontram, invadindo assim novas células (Goodswen *et al.*, 2013). Os taquizoítos, forma capaz de causar infeção aguda no HI, podem infetar vários tipos de células, nomeadamente células neurais, endoteliais, vasculares, renais, miócitos, hepatócitos, macrófagos alveolares, fibroblastos e trofoblastos da placenta (Dubey *et al.*, 2006; Goodswen *et al.*, 2013). Estes têm uma forma lunar com aproximadamente 2-6mm, têm um núcleo central e, ao contrário dos bradizoítos, não têm grânulos de amilopectina (Dubey *et al.*, 2006). Estes podem também atravessar a barreira placentária e causar infeção fetal. Fetos congenitamente infetados podem morrer no útero, ser reabsorvidos, mumificados, ou ocorrer o nascimento de nados-mortos. Bezerros infetados nos últimos meses da gestação, após o início do desenvolvimento do sistema imunológico fetal, tendem a sobreviver. Estes podem nascer clinicamente normais, porém cronicamente infetados. As mães infetadas podem também transmitir esta infeção numa gestação subsequente (Thurmond & Hietala, 1997; Fioretti *et al.*, 2003).

Os taquizoítos são disseminados pela corrente sanguínea e pelo sistema linfático e podem induzir uma resposta imune. Estes podem lisar células hospedeiras por multiplicação ativa, levando assim à morte celular. No estádio inicial da infeção, os taquizoítos provavelmente modulam as funções das células hospedeiras, proporcionando uma oportunidade para a ocorrência da doença. Mais tarde na infeção, no entanto, os taquizoítos são alvo de destruição pelo hospedeiro e a sua capacidade de estabelecer ou prolongar a doença é diminuída (Innes *et al.*, 2002; Goodswen *et al.*, 2013). Os taquizoítos podem diferenciar-se em bradizoítos em reação a uma resposta imune (Goodswen *et al.*, 2013). Essa transformação ocorre nas células neurais (fase lenta de divisão assexuada), quando uma forte resposta imunitária é montada contra os protozoários no organismo (Haddad *et al.*, 2005).

Apesar de todas as características apresentadas acima, algumas especificações do ciclo de vida completo de *N. caninum* ainda não foram totalmente explicadas (Olmo *et al*., 2017).

1.2.3. Transmissão

Os HD podem infetar-se através da ingestão de tecidos de animais infetados contendo quistos (carne, placentas, carcaças de bezerros infetados congenitamente) ou de água contaminada com oocistos de *N. caninum* (transmissão horizontal), (Andreotti *et al.*, 2003; Marugan-Hernandez, 2017).

No HI, os dois mecanismos de infeção por *N. caninum* são a transferência do parasita da mãe para o feto por via transplacentária (transmissão vertical ou infeção congénita) e a ingestão de oocistos esporulados no meio ambiente, encontrados principalmente em água e/ou alimentos contaminados (transmissão horizontal ou infeção pós-natal) (Olmo *et al.*, 2017; Florencia *et al.,*2017). A ingestão de oocistos esporulados é o único modo de infeção natural demonstrado em bovinos após o nascimento (de Marez *et al.*, 1999).

A transmissão vertical é a via de infeção mais importante nos HI. Podendo ocorrer ao longo de várias gerações, é o principal mecanismo de manutenção e expansão da infeção na exploração (Anderson *et al.*, 1997; Dubey *et al.*, 2007). Considera-se que seja a forma de transmissão mais eficiente de parasitas em bovinos. A transmissão vertical parece predominar em efetivos infetados endemicamente (Atkinson *et al.*, 2000). Há evidências de que a transmissão horizontal é predominante em casos de epidemias de aborto relacionadas com *N. caninum* (Thurmond & Hietala, 1997). Apesar de a infeção vertical continuar a ser o modo predominante de transmissão global, aparentemente, existem fatores desconhecidos que afetam

o equilíbrio entre a transmissão vertical e horizontal e a expressão clínica de distúrbios relacionados com *N. caninum* (Hobson *et al.*, 2005).

Uma forte evidência de transmissão transplacentária de *N. caninum* foi obtida pela comparação da seroprevalência em mães e seus descendentes. Em bovinos e outros ruminantes, não há transferência de anticorpos da mãe para o feto, nem mesmo através de uma placenta danificada, devido ao seu tipo de placenta - sindesmocorial (Anderson *et al.*, 1997; Dubey *et al.*, 2007). A imunidade passiva é transferida da mãe para o bezerro após o nascimento, através do colostro (Anderson *et al.*, 1997). Portanto, a deteção de anticorpos específicos no soro pré-colostral de bezerros indica a síntese *in útero* de anticorpos pelo feto. No entanto, a ausência de anticorpos no feto não é conclusiva da ausência de infeção, porque a síntese de anticorpos no feto depende do estádio da gestação, do nível de exposição e do tempo entre a infeção e o aborto (Dubey, 2003). O resultado pode ser negativo principalmente se o feto tiver sido infetado no final da gestação ou quando o sistema imune fetal ainda seja imaturo (Anderson *et al.*, 1997; Dubey *et al.*, 2007). Nesse caso, após o nascimento e após a ingestão de colostro, os animais só devem ser testados após os 6 meses de idade, a fim de evitar a presença de anticorpos colostrais e, consequentemente, falso-positivos (Álvarez-García *et al.*, 2013).

A transmissão transplacentária pode ser exógena, se as vacas forem infetadas (pela ingestão de oocistos esporulados no meio ambiente) durante a gestação, ou endógena, se ocorrer reativação (recrudescência) de bradizoítos existentes no organismo da vaca infetada, durante a gestação. Em ambos os casos, os taquizoítos atravessam a barreira placentária (Trees & Wiliams, 2005). A transmissão vertical transplacentária endógena pode levar ao aborto, porém, na maioria dos casos nascem bezerros saudáveis, persistentemente infetados (Anderson *et al.*, 1997; Dubey *et al.*, 2006).

Vacas persistentemente infetadas transmitem a infeção por *N. caninum* aos seus descendentes em gestações consecutivas ou de forma intermitente, variando de 50 a 95% (Fioretti *et al.*, 2003; Cabral *et al.*, 2009). A taxa de infeção transplacentária endógena pode assim diminuir em gestações subsequentes, indicando o desenvolvimento de imunidade no hospedeiro, impedindo assim esse tipo de transmissão (Anderson *et al.*, 1997; Marugan-Hernandez, 2017). A idade da vaca, o número de lactações e a história de aborto geralmente não afetam a taxa de infeção congénita, porém existem relatos de que em bovinos persistentemente infetados, a transmissão vertical é mais eficiente em vacas mais jovens do que em vacas mais velhas, verificando-se uma diminuição da taxa de infeção com o aumento da paridade da mãe (Dubey, 2003).

Mesmo baixos níveis de transmissão horizontal podem ser importantes na manutenção da infeção dentro dos efetivos, porque a transmissão por infeção transplacentária endógena é inferior a 100% e, portanto, levaria a uma contínua diminuição da prevalência de infeção nos grupos infetados (Dubey *et al.*, 2007). Existem cada vez mais evidências para a ocorrência de infeção horizontal em bovinos, como o perfil de um dado surto de abortos associados a *N. caninum* que sugere uma exposição de fonte pontual, a seropositividade crescente com a idade, e a falta de uma associação entre a seropositividade de mães e filhas em efetivos infetados (Dubey *et al.*, 2006).

Os bezerros recém-nascidos podem ser infetados através da a ingestão de leite contaminado com taquizoítos (Dijkstra *et al.*, 2001). Dubey & Schares (2006) consideram que bovinos infetados por Neospora não podem ser utilizados para a ordenha. No entanto, não há ainda evidências conclusivas de que a transmissão lactogénica de *N. caninum* ocorra na natureza (Dubey *et al.*, 2007). *N. caninum* também pode ainda ser excretado nas descargas uterinas de bovinos infetados, sendo a ingestão de membranas fetais ou fluídos uterinos (contendo taquizoítos) uma possível fonte de infeção (Dubey *et al.*, 2006).

Nascimentos de bezerros seronegativos após inseminações artificiais indicam que não ocorre transmissão venérea (Dubey *et al.*, 2007; Florencia *et al.,*2017). Não foi reportada ainda transmissão de bovino para bovino ou para humanos (Anderson *et al.*, 1997; Dijkstra *et al.*, 2001; Dubey *et al.,* 2007). É improvável também que ocorra por transferência de embriões de *N. caninum* em bovinos, e a transferência de embriões é mesmo recomendada como um método de controlo para prevenir a transmissão vertical de Neosporose (Dubey, 2003).

1.2.4 Patogenia

Pouco se sabe sobre a distribuição e persistência de *N. caninum* em tecidos bovinos adultos infetados após o nascimento (Dubey *et al.*, 2007). Os principais fatores que influenciam a patogénese da doença estão relacionados à invasão, replicação e estabelecimento do parasita na célula hospedeira e a habilidade do hospedeiro em montar uma resposta imune eficiente para inibir a proliferação e a persistência do parasita (Marugan-Hernandez, 2017).

Quando *N. caninum* invade as células uterinas, multiplica-se e causa destruição dos tecidos fetais e maternos na interface materno-fetal, iniciando uma resposta inflamatória, estendendo-se posteriormente para as membranas placentárias fetais (corioalantóide), entre os cotilédones (Andreotti *et al.*, 2003). Regidor-Cerrillo e colaboradores (2014) verificaram que, em todas as novilhas infetadas, a infeção é acompanhada por uma resposta imunitária

consistente, a partir da segunda semana após a infeção, que se verifica pela produção precoce de citocinas interferão (IFN) - γ / interleucina (IL) 4 sob estimulação específica de leucócitos mononucleares, uma resposta imunoglobulina (Ig) G específica (aumento de IgG2), aumento de células T auxiliares Tipo 1 e uma sobreregulação dos níveis de ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) de citocina na placenta materna. Essa é uma indicação de que tanto a imunidade humoral quanto a mediada por células respondem na tentativa de controlar a infeção. Após uma infeção primária, o IFN- γ ativa uma resposta pró-inflamatória de macrófagos e outras células mononucleares que supostamente induzem a diferenciação de taquizoítos para bradizoítos e a formação e manutenção de quistos teciduais. Essa interconversão entre os estádios de bradizoíto e taquizoíto desempenha um papel crucial no recrudescimento e no estabelecimento de infeções crónicas (Goodswen *et al.*, 2013; Regidor-Cerrillo et al., 2014).

A competência imune fetal desenvolve-se progressivamente durante os cerca de 280 dias de gestação bovina, não estando desenvolvida até que o primeiro terço da gestação esteja completo e, consequentemente, o feto é vulnerável nesse período inicial em que o timo, o baço e os gânglios linfáticos periféricos são imaturos, sendo frequente a ocorrência de morte fetal e reabsorção do mesmo nos casos de infeção/recrudescimento por *N. caninum* nesse período (Marugan-Hernandez, 2017).

O aborto pode ocorrer como consequência de diferentes fatores que afetam o feto e/ou placenta: (1) proliferação do parasita danificando tecidos fetais essenciais ou a placenta; (2) oxigenação ou nutrição insuficientes do feto devido a dano placentário; (3) libertação de prostaglandinas maternas causadoras de luteólise e, consequentemente, aborto; (4) alteração da imunidade placentária associada à libertação de citocinas pró-inflamatórias maternas, que podem causar rejeição do feto (Marugan-Hernandez, 2017).

Evidências indicam que em bovinos persistentemente infetados, o *N. caninum* está confinado ao Sistema Nervoso Central e ao músculo esquelético (Peters *et al.*, 2001).

1.2.5 Sintomatologia

N. caninum foi identificado em casos de encefalomielite e miosite, resultando em paralisia em cachorros e morte precoce dos mesmos (Bjerkâs *et al.*, 1984).

O quadro clínico sugestivo de Neosporose em bovinos jovens, manifesta-se, raramente, em animais com menos de 2 meses de idade, e consiste maioritariamente na presença de sinais neurológicos (resultantes de encefalomielite) e polimiosite. Estes incluem caquexia, paresia/paralisia, fraqueza muscular, disfunção dos membros anteriores e/ou posteriores (por

exemplo fletidos ou em hiperextensão) e dificuldade em se levantar (Dubey, 2003; Uesaka *et al.*, 2018). Ao exame neurológico pode-se notar ainda, diminuição do reflexo patelar, ataxia e perda de proprioceção consciente. Manifestações congénitas mais raras, também reportadas, incluem exoftalmia, microencefalia, hidrocefalia, hipoplasia cerebelar e estenose do canal medular e escoliose (Dubey, 2003).

Na maioria dos casos, o gado adulto infetado com *Neospora caninum* não exibe sinais clínicos de doença. Até 2013, o único sinal clínico não reprodutivo em adultos serologicamente positivos já descrito foi a perda de peso em bovinos de carne (Goodswen *et al.*, 2013). Porém, (Regidor-Cerrillo *et al.*, 2014) posteriormente verificou que vacas infetadas aumentam gradualmente a temperatura rectal, ficando febris, com um pico da temperatura cinco dias após a infeção (Regidor-Cerrillo *et al.*, 2014).

Em bovinos adultos, os sinais amplamente reconhecidos e sugestivos de infeção por *N. caninum* são a ocorrência de aborto e nados mortos em fêmeas (Andreotti *et al.*, 2003). Esta é considerada a manifestação clínica mais importante por ter um grande impacto económico (Dubey *et al.*, 2006).

Diversos estudos verificaram que vacas seropositivas se apresentavam clinicamente normais, no entanto apresentavam abortos, bezerros doentes ou clinicamente saudáveis porém congenitamente infetados (Haddad *et al.*, 2005; Dubey *et al.*, 2006; Álvarez-García *et al.*, 2013). Após a infeção atingir a placenta e os tecidos fetais, ocorre morte fetal (Regidor-Cerrillo *et al.*, 2014). Como resultado da morte fetal pode ocorrer reabsorção, fetos mumificados, autolisados ou nados-mortos (Dubey, 2003; Álvarez-García *et al.*, 2013).

A severidade e resultado da Neosporose aparenta estar relacionada com o momento de infeção. Em estádios iniciais da gestação, ocorre morte embrionária precoce e os embriões são reabsorvidos. A morte embrionária precoce é provável ser causada pela presença de citocinas pró-inflamatórias tipo T *helper* na interface materno-fetal (placenta) prejudicando a conexão placentária, pois o sistema imunitário materno desenvolve uma resposta contra o parasita (Innes *et al.*, 2002). Se a infeção ocorrer entre os 3-8 meses, devido à reduzida defesa imunológica da vaca nessa fase, que predispõe a um aumento na população de *N. caninum* e subsequente invasão da placenta e feto, pode haver morte fetal e consequente aborto de fetos autolisados (Barr *et al.*, 1991a; Innes *et al.*, 2002; Álvarez-García *et al.*, 2013).

Para além da morte embrionária/fetal e aborto, pode ocorrer ainda o nascimento de nados-mortos, de bezerros deformados, ou o nascimento de descendência clinicamente normal, porém infetada (Dubey, 1999). Estas últimas, ocorrem principalmente se a infeção ocorrer a

partir do segundo trimestre de gestação, uma vez que os fetos são mais imunocompetentes (Regidor-Cerrillo *et al.*, 2014; Marugan-Hernandez, 2017). Dubey e colaboradores (2007) afirmam que existe um maior risco de aborto e abortos recorrentes em vacas seropositivas (2-3 vezes superior segundo Nogareda e colaboradores (2007)) do que nas seronegativas. Vacas infetadas que tenham sofrido aborto anteriormente têm um risco de aborto 5.6 vezes superior, comparativamente a vacas infetadas congenitamente que não tenham sofrido aborto (Thurmond & Hietala, 1997). Considera-se que o modo de infeção também tenha influência, principalmente a transmissão vertical (que é considerada a mais provável de manter a infeção em efetivos bovinos) (Bildfell *et al.*, 1994; Wouda, 2000; Hall *et al.*, 2005).

López-Gatiu e colaboradores (2004) verificaram uma estreita associação entre a seropositividade a *N. caninum* e o aborto em animais que abortam após 90 dias de gestação. Além disso, a ocorrência de aborto em animais seropositivos é significativamente maior durante o segundo trimestre de gestação e menor durante o terceiro.

Até 95% dos bezerros nascidos de vacas seropositivas permanecem clinicamente normais apesar de estarem infetados (Dubey, 2003). Estes, aparentemente saudáveis, infetados congenitamente, permanecem persistentemente infetados por toda a vida e podem sofrer abortos em gestações subsequentes (Thurmond & Hietala, 1997; Fioretti *et al*., 2003). O motivo para nem todos terem sintomatologia está relacionado com o sistema imunitário, ou seja, na presença de animais imunocomprometidos desenvolve-se Neosporose grave. Por outro lado, animais imunocompetentes geralmente não apresentam sinais clínicos evidentes de infeção (Nishikawa, 2017). A existência de sinais clínicos também varia com a idade do feto no momento de infeção, o estádio de desenvolvimento do seu sistema imunitário, do tempo de exposição ao parasita e da distribuição das lesões no sistema nervoso central (Anderson *et al.*, 1997). Embora a infeção por *N. caninum* possa causar lesões em vários órgãos, o cérebro fetal é o tecido mais consistentemente afetado (Dubey, 2004).

O aborto pode ocorrer a partir dos três meses de gestação (maioritariamente entre 5-6 meses) de forma esporádica, endémica ou epidémica (Dubey, 2003; Cabral *et al.*, 2009). Acredita-se que os padrões epidémicos de aborto sejam devidos a uma infeção primária de mães não infetadas que estão expostas a uma única fonte de infeção quase ao mesmo tempo, como os cães (Dubey *et al.*, 2007). O desfecho mais dramático do padrão epidémico é a "tempestade de abortos" definida como mais de 10% das vacas em risco (ou seja, gestantes) que abortam dentro de um período de 6-8 semanas (Dubey, 2003). O padrão endémico da infeção é caracterizado pela infeção crónica de longo prazo de um efetivo, onde o parasita pode ser

encontrado em linhas familiares, como resultado da transmissão transplacentária recorrente, podendo o aborto persistir num efetivo por vários meses ou anos (Hall *et al.*, 2005). Por definição, casos de aborto esporádico, ocorrem apenas ocasionalmente dentro de um efetivo (Goodswen *et al.*, 2013).

Dubey e colaboradores (2007) ponderam se a presença do parasita ou do DNA do mesmo significa que *N. caninum* tenha causado o aborto, especialmente em animais persistentemente infetados e, como tal, essa relação causa-efeito também tem sido objeto de estudo.

1.2.6 Fatores de risco

Existem diversos estudos de fatores de risco que avaliam o risco de bovinos individuais ou efetivos serem infetados com *N. caninum* ou sofrer abortos associados a essa infeção. Esses riscos (risco de infeção e risco de aborto) estão positivamente associados entre si, mas são influenciados de forma diferente (Dubey *et al.*, 2007).

A proporção relativa de transmissão vertical *versus* transmissão horizontal numa exploração ou região é dependente da seroprevalência atual de infeção na população bovina, da distribuição de cães infetados na região e do seu acesso ao gado e à alimentação destes (Haddad *et al.*, 2005). A presença de cães aumenta a probabilidade de deteção de anticorpos anti-*N. caninum* em bovinos e explorações em 1,25 e 1,83 vezes, respetivamente (McAllister *et al.*, 1998; Goodswen *et al.*, 2013). Porém, enquanto alguns autores verificaram essa associação positiva (Bartels *et al.*, 1999; Wouda *et al.*, 1999; Dijkstra *et al.*, 2002), outros não obtiveram associação (Mainar-Jaime *et al.*, 1999; Romero, 2002).

Silva e colaboradores (2008) descobriram também que em explorações com alta prevalência de anticorpos anti-*N. caninum* existem animais cujo estado nutricional era baixo, enquanto que a seroprevalência foi menor em explorações onde o estado nutricional dos animais era normal.

Ould-Amrouche e colaboradores (1999) verificaram ainda uma associação negativa da infeção com a presença de gatos e a repartição dos períodos de parto.

A ingestão de colostro pode ser também uma possível fonte de infeção, em que Dijkstra e colaboradores (2002) referem que este não é visto como fator de risco, enquanto que Corbellini e colaboradores (2006) observaram que a ingestão de colostro representa um fator de risco para a infeção por *N. caninum* em bovinos. Na Tabela 3 encontram-se os diversos fatores de risco para infeção por *N. caninum* em bovinos e a sua respetiva influencia.

Tabela 3. Fatores que afetam o risco de infeção bovina por *N. caninum* (Adaptado de Goodswen *et al.* (2013) e Dubey *et al*. (2007))

Fator de risco	Forma como influencia o risco de infeção
Idade dos animais	influencia a probabilidade de transmissão horizontal/vertical, o abate seletivo e a taxa de substituição
Ingestão de tecidos/fluídos	Placenta - ↑ risco de infeção Fetos abortados – sem risco
Presença e número de outros animais (exploração ou proximidades)	Cães, roedores, coelhos, patos, coiotes, raposas - ↑ risco de infeção
	Gatos – fator de proteção (predador de hospedeiros intermediários)
	Aves - ↑ risco de infeção (vetor de oocistos)
Alimento e água	Pastagem, forragem e água potável contaminados – possíveis fontes de infeção
	Pastoreio em pastagens no verão – fator de proteção (menor sobrevivência de oocistos)
	Manjedouras fixas de feno (local de preferência de partos - ↑ número de HD e possível contaminação)
	Recursos naturais de água (principalmente água parada) – ↑ risco de infeção
	Forragem má qualidade – crescimento fúngico e ↑ risco contaminação – ↓ imunidade - ↑ risco infeção
	Grande stock de alimento - ↑ risco de contaminação
Época de parto	Menor época de parto – maior risco de infeção
Maneio	Intensivo - ↑ risco de infeção
	↑ densidade populacional - ↑risco de infeção
Clima	Temperatura amena e humidade - ↑ esporulação - ↑ risco de infeção e crescimento fúngico
Densidade populacional humana (proximidade com vila/cidade)	↑ densidade populacional humana - ↑ densidade populacional de cães - ↑ risco de infeção
Agentes infeciosos	Infeções causam stress/imunossupressão - ↑ risco de infeção
Animais de substituição	Provenientes de explorações negativas - fator de proteção
	Criação de novilhas próprias de substituição - ↑ risco de infeção

Legenda: ↑ - aumento; ↓ - diminuição

Os principais fatores de risco de aborto associado a Neosporose bovina estão referidos na Tabela 4.

Tabela 4. Fatores que afetam o risco de aborto associado a *N. caninum* em bovinos (Adaptado de (Goodswen *et al.*, 2013))

Risco de Aborto
Número de oocistos ingeridos
Estádio gestacional
Estado imunitário da mãe
Vacas seropositivas com maior propensão para aborto que vacas seronegativas

Para além dos referidos acima, o risco de perda fetal precoce aumenta nas explorações de maneio intensivo para produção leiteira, comparativamente a explorações de maneio extensivo de carne (López-Gatiu *et al.*, 2004).

Um título de anticorpos mais alto e durante um longo período de tempo, poderá indicar um aumento no número de parasitas, aumentando assim a probabilidade de infeção fetal e, consequentemente, um maior risco de aborto (McAllister *et al.*, 1996; Quintanilla-Gozalo *et al.*, 2000; Dubey *et al.*, 2007; Almería *et al*., 2009).

Hassig & Gottstein (2002) associaram positivamente a serologia positiva para *Coxiella burnetti*, a proximidade a uma cidade/vila/moradia e a positividade do animal e da sua respetiva mãe, com o aumento do risco de abortos relacionados a *N. caninum*. Em contraste, a serologia positiva do efetivo para vírus da diarreia viral bovina (BVDV), espécies de *Leptospira* e *Chlamydia psittaci* (presumivelmente devido à vacinação), representa um risco diminuído para aborto por *N. caninum*.

Existe uma associação positiva significativa, embora pequena, entre a ocorrência de aborto por *N. caninum* e a seroprevalência de *N. caninum*: para cada aumento de 1% na seroprevalência do efetivo para *N. caninum*, há um aumento de 6% no risco de o efetivo ter sofrido um aborto relacionado a *N. caninum* (Hobson *et al.*, 2005). Segundo Haddad e colaboradores (2005), em efetivos com prevalência de *N. caninum* < 5%, os abortos por Neosporose podem ocorrer numa taxa igual ou inferior a 1 por cada 100 vacas por ano.

Os abortos induzidos por Neosporose ocorrem durante todo o ano (Dubey, 2003).

Recentemente, foi ainda demonstrado que a suplementação de progesterona durante a gestação diminui o risco de aborto em vacas leiteiras infetadas por *Neospora* com altos títulos de anticorpos (Bech-Sàbat *et al.*, 2007).

1.2.7 Diagnóstico

O diagnóstico da infeção por *N. caninum* é dispendioso e por vez difícil. Este é realizado pela associação entre o histórico do efetivo, os sinais clínicos apresentados e diversos achados característicos da infeção (Andreotti *et al.*, 2003; Antoniassi *et al.*, 2013). De um modo geral, o diagnóstico é mais fiável se várias zonas e testes forem utilizados (Dubey, 2003). Atualmente, estão disponíveis diversos exames complementares de diagnóstico que sugerem e/ou confirmam a presença de Neosporose.

Os métodos diretos utilizados no diagnóstico e pesquisa de *N. caninum* são a histopatologia, a imuno-histoquímica, o isolamento *in vitro* e *in vivo,* a deteção do DNA do parasita por PCR e a observação dos quistos nos tecidos a fresco (sem coloração) (Andreotti *et al.*, 2003). Dubey (2003) refere que idealmente deverá realizar-se teste serológico e histologia fetal.

Por outro lado, os métodos indiretos utilizados no diagnóstico e pesquisa de *N. caninum* são a imunofluorescência indireta e o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA).

O facto de a maioria dos casos de Neosporose em bovinos ser assintomático ou com sinais clínicos inespecíficos, torna o diagnóstico clínico da doença mais difícil. Consequentemente, o diagnóstico laboratorial é assim imprescindível para confirmar a infeção por *N. caninum* (Andreotti *et al.*, 2003).

Apesar de alguns métodos de diagnóstico serem referidos como *gold standard* por alguns autores, não existe um teste que sirva de diagnóstico definitivo de forma individual para Neosporose bovina.

1.2.7.1 Exame microscópico a fresco sem coloração

Através do exame microscópico direto sem coloração, é possível detetar até 20 quistos de *N. Caninum* numa amostra com 2-3 mm de cérebro ou medula espinhal do animal suspeito. Os quistos (Figura 3) geralmente são pequenos (~25 μm), com parede delgada (≤ 1μm) e espessa (~1μm) (Andreotti *et al.*, 2003).

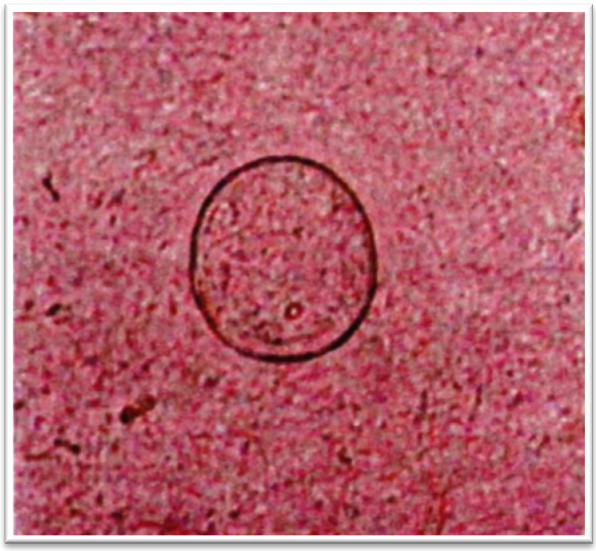


Figura 3. Observação microscópica, sem coloração, de quisto de *N. caninum* presente no cérebro de um gerbilo inoculado com amostras de cérebro de bezerro com Neosporose (aumento 1.000x) (Andreotti *et al.*, 2003).

1.2.7.2 Histopatologia

Um dos exames *gold standard* para determinar o verdadeiro estado de infeção por *N. caninum* é a histopatologia (Baszler *et al.*, 1999). A identificação do parasita pode ser feita através da análise histológica de quistos tecidulares corados com hematoxilina-eosina (Dubey & Schares, 2006).

Para avaliação histopatológica, tal como no exame a fresco, devem ser analisados o cérebro e a medula espinhal (Andreotti *et al.*, 2003). Podem ainda ser avaliados o coração, o fígado e a placenta. Algumas das lesões sugestivas de infeção por *Neospora caninum* observadas na histopatologia são: miosite focal não supurativa, epicardite e/ou miocardite não supurativa, pneumonia intersticial não supurativa associada à necrose celular focal, meningoencefalite não supurativa necrosante multifocal e hepatite periportal não supurativa (com necrose hepática focal) (Andreotti *et al.*, 2003; Cabral *et al.*, 2009). As lesões necrosantes devem-se à multiplicação intracelular dos taquizoítos. Nos fetos abortados, as principais lesões encontradas são encefalomielite necrosante não supurativa multifocal e placentite multifocal coalescente (Dubey *et al.*, 2006; Regidor-Cerrillo *et al.*, 2014). Além das coleções proliferantes de taquizoítos podem também estar presentes quistos com bradizoítos, com frequência em áreas sem necrose ou inflamação significativa (Dubey *et al.*, 2006).

Na maioria dos casos, os protozoários são raramente observados nos cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina, sendo necessária a deteção do parasita por

imuno-histoquímica ou PCR (Andreotti *et al.*, 2003; Cabral *et al.*, 2009).

Todas as carúnculas e cotilédones maternos em vacas infetadas apresentam lesões difusas e um infiltrado inflamatório. Tendo em conta que as lesões associadas aos parasitas encontrados no feto são geralmente escassas, supõe-se que lesões disseminadas em cotilédones e carúnculas denotem alto tropismo do parasita pela placenta e, de fato, isso pode ser um fator-chave para a ocorrência de aborto após infeção primária durante o início da gestação. Para além disso, o fato de a carga parasitária ser muito maior nas amostras de cotilédones do que de carúnculas sugere que os parasitas se multiplicam ativamente no lado fetal da placenta, pois no lado materno é controlado pela resposta imunitária da mãe. Assim, a imunocompetência fetal no momento da infeção pode desempenhar um papel fundamental na sobrevida fetal, limitando as lesões nos tecidos fetais (Regidor-Cerrillo *et al.*, 2014).

1.2.7.3 Imuno-histoquímica

A imuno-histoquímica é uma técnica que combina morfologia e anticorpos ligados ao antigénio, marcados com um cromogénio (Cabral *et al.*, 2009).

Andreotti e colaboradores (2003) e Cabral e colaboradores (2009) sugerem que, quando o cérebro fetal se encontra autolisado, outras vísceras fetais como o pulmão, rins, coração, fígado, baço, timo, placenta e músculos esqueléticos podem ser utilizadas adequadamente para o diagnóstico presuntivo de Neosporose. Porém, mesmo autolisado, o cérebro é o órgão mais adequado para o diagnóstico por imuno-histoquímica de *N. caninum*. Este método de diagnóstico permite a deteção de bradizoítos e taquizoítos de *N. caninum* (Lindsay & Dubey, 1989; McAllister *et al.*, 1996).

A imuno-histoquímica é um teste muito específico, porém pouco sensível (Antoniassi *et al.*, 2013). Segundo Baszler e colaboradores (1999) isto deve-se ao baixo número de parasitas e à baixa qualidade do tecido fetal (pode estar autolisado, mumificado ou macerado). É necessária a coloração de vários cortes histológicos do sistema nervoso central para encontrar alguns parasitas (Andreotti *et al.*, 2003). A ausência de taquizoítos ou quistos de *N. caninum* em tecidos com lesões características de protozoários não descarta a possibilidade de o aborto ter sido causado por esse agente, pois a sua distribuição pode ser esporádica e dispersa nos tecidos. Além disso, outras causas como a presença de reações inflamatórias, autólise e congelamento e/ou fixação com formalina das amostras podem afetar a morfologia e antigenicidade do protozoário, além de influenciar na sua marcação, podendo assim ocorrer falso-negativos (Cabral *et al.*, 2009; Antoniassi *et al.*, 2013).

O resultado positivo aparece como vacúolos parasitóforos, antigénio particulado ou marcação citoplasmática em células morfologicamente compatíveis com macrófagos (Regidor-Cerrillo *et al.*, 2014).

1.2.7.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A PCR é uma das técnicas mais importantes da biologia molecular e consiste na amplificação de segmentos específicos do DNA. O seu resultado é analisado em gel de eletroforese (Figura 4). A utilização de técnicas como a PCR aumenta a probabilidade de detetar a infeção por *N. caninum* nos fetos (Andreotti *et al.*, 2003).

Baszler e colaboradores (1999) referem também que uma das principais desvantagens da PCR é a contaminação por DNA exógeno, podendo levar a falso-positivos.

Diversos métodos baseados em PCR foram desenvolvidos, focados na região ITS1 e a sequência Nc5, utilizando o par de *primers* Np4-Np7 (Baszler *et al.*, 1999), específicos para *N. caninum*, como PCR *nested* e *hemi-nested*, visando melhorar a sensibilidade e especificidade do teste (Cabral *et al.*, 2009). As sensibilidades da PCR são de aproximadamente 100% para tecido cerebral fixado em formalina e embebido em parafina e cerca de 77% para cérebro fresco. As especificidades são de cerca de 94% para tecido cerebral embebido em parafina fixado com formalina e de aproximadamente 100% para cérebro fresco (Baszler *et al.*, 1999).

O DNA de *N. caninum* é esporadicamente detetado nos tecidos (músculos e cérebro) dos animais infetados. Porém, é reportado como detetado em placentomas, carúnculas e cotilédones de todas as vacas infetadas. Em relação aos tecidos fetais (cérebro, fígado, pulmões, coração, músculo e fluídos fetais), estes são positivos para o DNA de *N. caninum* em quase todos os fetos infetados (Regidor-Cerrillo *et al.*, 2014). Baszler e colaboradores (1999) referem que o cérebro é o tecido mais confiável para a análise de PCR. A não deteção de DNA em alguns órgãos fetais, demonstrados como positivos com a imuno-histoquímica, pode ser devida a degradação do DNA por autólise (Cabral *et al.*, 2009).

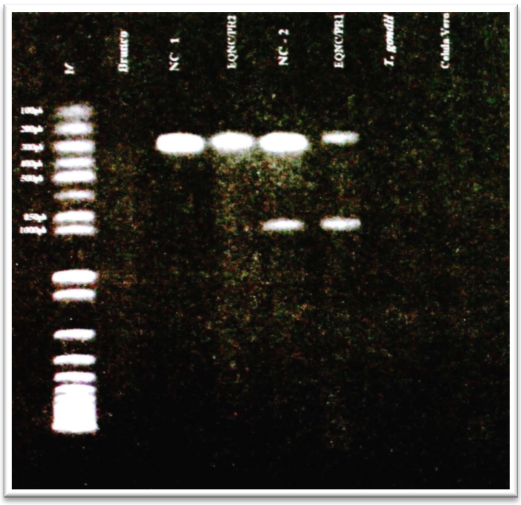


Figura 4. Produtos da PCR obtidos com diferentes estirpes de *Neospora caninum* (Andreotti *et al.*, 2003).

1.2.7.5 Serologia – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA)

A serologia para deteção de anticorpos IgG (IgG1 e IgG2) contra *N. caninum* (Dubey *et al.*, 2007), no soro ou no líquido cefalorraquidiano (Uesaka *et al.*, 2018), é um dos métodos de diagnóstico mais utilizado, no entanto o seu resultado pode ser inconclusivo (Dubey & Lindsay, 1996) e não há nenhum teste de referência apropriado para definir um verdadeiro positivo ou negativo (Ortega-Mora *et al.*, 2006). Estão disponíveis diversos testes ELISA comerciais com ampla distribuição na Europa e América do Norte (Álvarez-García *et al.*, 2013). Contudo, os elevados custos da sua aquisição são o principal obstáculo ao seu uso em muitos países e explorações bovinas (Campero *et al.*, 2017). O ELISA apresenta algumas vantagens em relação à imunofluorescência indireta (IFI), tais como a realização de um maior número de análises, automatização, rapidez, e registo das reações realizado de maneira objetiva (Andreotti *et al.*, 2003).

O valor de *cut-off* é determinado com soros de referência (controlo positivo e negativo). No ELISA, valores de absorvância superiores aos do *cut-off* indicam resultados positivos. A maioria dos testes de ELISA para *N. caninum* utiliza o produto que resulta da lise dos taquizoítos, preparados por homogeneização ultrassónica (sonicação) ou por dissolução com detergentes, resultando numa mistura de vários antigénios de origem intracelular ou citoplasmática. Nos soros com baixos títulos de anticorpos, alguns antigénios podem não ser detetados.

A serologia, como método de diagnóstico, é mais indicada para avaliar a exposição e o risco de infeção por *Neospora* num efetivo, do que para o diagnóstico de aborto em bovinos, uma vez que a presença de anticorpos específicos no soro de uma vaca abortada é apenas indicativa de exposição a *N. caninum* (Andreotti *et al.*, 2003; Dubey, 2004). No caso de aborto, o diagnóstico é feito geralmente pelos exames histopatológico e imuno-histoquímico dos tecidos fetais (Andreotti *et al.*, 2003).

As respostas serológicas diferem entre efetivos infetados endemicamente e epidemicamente. Índices mais elevados de ELISA (IRPC) em vacas que abortam ou não, são encontrados em maior número em efetivos endémicos em comparação com efetivos epidémicos. A transmissão vertical em efetivos endémicos pode ser refletida por índices mais altos de ELISA, que estão associados a uma infeção latente ou crónica (isto é, libertação ou recrudescência de antigénios citoplasmáticos ou de bradizoítos) (Atkinson *et al.*, 2000; Dubey, 2004).

A ausência de anticorpos contra *N. caninum* em vacas que abortam, poderá excluir a Neosporose como causa do aborto. Contudo, recorrendo ao PCR e exames histopatológicos, podem ser encontrados resultados positivos em fetos dessas mães. A razão para este acontecimento ainda não foi encontrada, todavia o fato de alguns indivíduos não sintetizarem anticorpos detetáveis contra o parasita, devido a imunotolerância inata ou adquirida, poderá justificar estes resultados. A presença de anticorpos específicos anti-*N. caninum* no soro fetal ou soro de bezerros pré-colostral indica infeção congénita. Porém, o desenvolvimento da resposta imune nos fetos bovinos ocorre entre o quatro e o quinto mês de gestação. Assim, o serodiagnóstico deve ser utilizado principalmente nos fetos bovinos com seis meses ou mais de idade gestacional. Acredita-se existir uma alta correlação entre seropositividade e a presença persistente do parasita nos animais infetados. As variações nos títulos podem afetar a sensibilidade do teste em diferenciar os bovinos falso-negativos dos verdadeiramente negativos. Na maioria das vacas com infeção natural por *N. caninum* que abortam, os níveis de anticorpos são máximos ou próximos do máximo, indicando que a sensibilidade de diagnóstico da maioria dos testes é alta quando a amostra de soro é pós-aborto (Andreotti *et al.*, 2003).

Andreotti e colaboradores (2003) referem ainda que os testes serológicos são úteis para identificar soros com níveis moderados a elevados de anticorpos contra *Neospora* como:

- Soros de vacas infetadas e com aumento gradual da infeção durante a gestação;
- Soros de vacas que abortaram devido a infeção por *N. caninum;*
- Soros de vacas e de bezerros no período pós-parto.

Porém, a análise serológica apresenta limitações nos casos de títulos baixos de anticorpos como:

- Nas vacas com flutuação ou queda de anticorpos após o parto ou aborto;
- Nas vacas que seroconverteram recentemente;
- Nos bezerros, alguns meses após o parto.

Embora *N. caninum* esteja intimamente relacionado a *Toxoplasma gondii,* algumas espécies de *Sarcocystis* e outros parasitas do Filo Apicomplexa, a reatividade cruzada não tem sido um grande problema (Dubey, 2003). Pelo contrário, autores como Gondim e colaboradores (2009) afirmam que a identificação de animais seropositivos para *N. caninum* pode ser prejudicada devido à reatividade cruzada com outros protozoários semelhantes, principalmente *N. hughesi* e *Hammondia heydorni*. Outra limitação, até ao momento do estudo realizado por Gondim e colaboradores (2009), é o fato de não existir teste serológico capaz de distinguir anticorpos anti-*N. caninum* de anticorpos anti-*N. hughesi*.

Cães com doença clínica parecem apresentar níveis mais elevados de anticorpos anti-*Neospora* do que cães subclínicos infetados, provavelmente refletindo o aumento da estimulação antigénica como resultado da proliferação do parasita (Atkinson *et al.*, 2000).

1.2.7.6 Serologia – Imunofluorescência Indireta (IFI)

A IFI foi o primeiro teste empregue no diagnóstico serológico da Neosporose, em 1988, sendo utilizado em várias espécies animais, como: cães, raposas, gatos, bovinos, ovinos, caprinos, búfalos, equinos, roedores e primatas (Andreotti *et al.*, 2003). A IFI, tal como o ELISA, deteta a presença de anticorpos anti-*N. caninum* (Álvarez-García *et al.*, 2013). Na IFI, os taquizoítos inteiros são fixados nas lâminas. O principio da IFI é a deteção de anticorpos direcionados aos antigénios da superfície celular dos taquizoítos, com o auxílio de um microscópio de fluorescência. Um resultado positivo da IFI (Figura 5) é indicado pela fluorescência de todo o taquizoíto, nos soros com títulos moderados a elevados. Uma fluorescência reduzida ou apical ocorre nos soros com títulos baixos ou nas reações cruzadas não especificas causadas por infeção com espécies relacionadas, como *T. gondii* (Andreotti *et al.*, 2003).

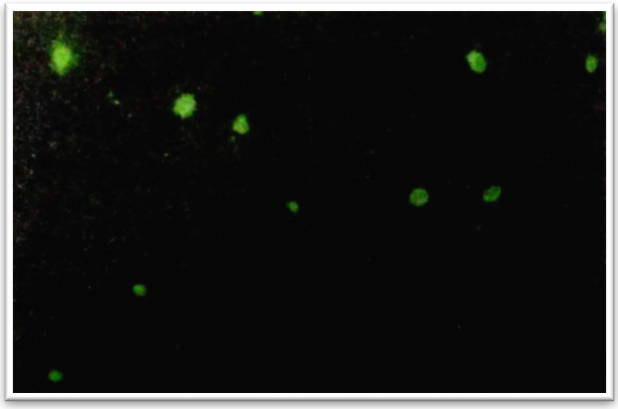


Figura 5. Imunofluorescência indireta positiva para *N. caninum* em soro de cão (aumento 400x). (Andreotti *et al.*, 2003)

Tal como a histopatologia, a reação de IFI é a metodologia de referência para pesquisa de anticorpos anti-*N. caninum*, sendo considerada o método de diagnóstico *gold standard* (Andreotti *et al.*, 2003).

A presença dos anticorpos IgM é indicativa de infeção aguda (pico às duas semanas e diminuição às 4 semanas após infeção), porém a cinética de produção de IgM na Neosporose ainda é pouco conhecida em bovinos. A determinação dos anticorpos IgG é utilizada para o diagnóstico de Neosporose em bovinos. Um aumento progressivo do título de anticorpos IgG, num dado período (após 4 semanas de infeção, durante 3-6 meses), geralmente é indicativo de infeção aguda (Moore *et al.*, 2002; Dubey & Schares, 2006). A destruição das imunoglobulinas por autólise, a morte do feto na fase aguda da infeção, a deteção de IgG ao invés de IgM e as flutuações no nível de anticorpos (que dependem do estado fisiológico da mãe e da atividade do parasita) podem contribuir para o insucesso da serologia fetal (Andreotti *et al.*, 2003; Innes *et al.*, 2005).

Ao contrário do que acontece com o ELISA, a IFI apresenta maiores títulos em vacas que abortam em efetivos epidémicos em comparação com efetivos endémicos. A transmissão horizontal em efetivos epidémicos pode ser refletida por títulos mais elevados de IFI, que resultam de uma infeção recente, como a captação de oocistos ou proliferação de taquizoítos, como resultado de um evento imunossupressor (Atkinson *et al.*, 2000). A idade do animal também pode afetar a seleção de um determinado *cut-off*. Por exemplo, um título de IFI de 1:640 ou 1:200 é considerado indicativo de infeção por *N. caninum* em bovinos adultos, enquanto valores mais baixos (1:80) são selecionados como *cut-off* para amostras de fetos

bovinos. Até mesmo um baixo título de 1:25 deve ser considerado específico para a infeção por *N. caninum* em fetos (Dubey, 2004).

A carga parasitária média, medida a partir do número de taquizoítos por mg de tecido, é significativamente maior nos cotilédones do que nas carúnculas das vacas infetadas (Regidor-Cerrillo *et al.*, 2014).

Como limitação, a IFI é demorada e dispendiosa em comparação com o ELISA, e por isso não é rotineiramente utilizado no rastreio de populações de bovinos para a Neosporose (Haddad *et al.*, 2005). Para além disso, os resultados serológicos de IFI e ELISA no diagnóstico de aborto por *N. caninum* devem ser confirmados, através da demonstração do parasita ou do seu DNA no feto, preferencialmente em associação com as lesões características da doença (Andreotti *et al.*, 2003).

1.2.7.7 Serologia – Teste de Aglutinação

Os testes de aglutinação também podem ser utilizados, detendo a vantagem de não requerer conjugados específicos e, portanto, serem adequados para espécies silvestres (Almería, 2013). Por outro lado, é um teste que apresenta diversos falso-positivos, (Ortega-Mora *et al.*, 2006; Moraveji *et al.*, 2012) não sendo recomendado por alguns autores (Álvarez-García *et al.*, 2013). O resultado positivo é representado pela presença de um precipitado de taquizoítos aglutinados (López-Gatiu *et al.*, 2004).

1.2.7.8 Serologia – Western blot / Imunoblot

O *Western blot* é outra técnica altamente sensível e específica, útil na deteção de anticorpos específicos contra *N. caninum*, melhorando bastante o seu diagnóstico (Dubey, 2003; Campero *et al.*, 2015). Porém, requer técnicos especializados e os resultados são demorados. Por isso, é geralmente apenas utilizado como teste confirmatório para resultados duvidosos (Campero *et al.*, 2015).

1.2.7.9 Teste de Avidez de Imunoglobulinas

Para determinar o valor da avidez dos anticorpos (força de ligação dos mesmos aos antigénios), devem ser obtidas amostras imediatamente após o aborto de vacas seropositivas (Dubey *et al.*, 2007). Os testes de avidez de IgG provaram ser valiosos na discriminação entre infeções agudas e crónicas em bovinos (Dubey, 2004; Goodswen *et al.*, 2013) e parecem promissores para distinguir aborto endémico e epidémico (Dubey, 2003). A ligação de IgG

aumenta com o tempo após a infeção, consequentemente, valores de avidez baixos (<50) e altos (>50) indicam infeção recente e crónica, respetivamente.

A concentração e o tipo de anticorpos presentes no soro de animais cronicamente infetados podem diferir em comparação com infeções agudas e, portanto, podem ser detetados de forma diferente por certos antigénios (Bjorkman *et al.*, 1999).

Em explorações com um padrão endémico de aborto e anticorpos de alta avidez em vacas abortadas, a transmissão vertical deve ser considerada a principal via de transmissão. Em contraste, a presença de anticorpos de baixa avidez, com padrão de aborto epidémico deve ser indicativa de exposição recente a *N. caninum* pela via horizontal (Dubey *et al.*, 2007).

1.2.7.10 Coprologia

No exame coprológico para pesquisa de oocistos de *N. caninum* em canídeos, é utilizado o método de centrífugo-flutuação, com utilização de uma solução saturada de açúcar. Os oocistos não esporulados de *N. caninum* são esféricos a subesféricos, medem 10 a 11 μm de diâmetro e contêm um esporonte central. Os oocistos esporulados contêm dois esporocistos, cada um com quatro esporozoítos. Os oocistos de *N. caninum* são semelhantes aos de *T. gondii, Hammondia hammondi* e *H. heydorni.* A observação de oocistos nas fezes de cães é difícil, dada a curta duração da excreção dos mesmos nas fezes dos HI, indicando que provavelmente o exame coprológico apresenta valor reduzido na deteção da doença (Andreotti *et al.*, 2003).

1.2.7.11 Isolamento in vitro / in vivo de N. caninum

No isolamento de *N. caninum*, os tecidos infetados são inoculados em cultivo celular e/ou em murganhos, imunodeprimidos ou imunodeficientes. O isolamento e cultivo de *N. caninum* permite a identificação do parasita, a produção de taquizoítos para testes serológicos, a avaliação dos taquizoítos aos diferentes fármacos, pesquisas do ciclo de vida, biologia e patogenia do parasita e pesquisas de manipulação genética do mesmo. As diferentes estirpes isoladas também permitem estudos de diversidade genética do parasita. O cérebro e a medula espinhal de bovinos, bezerros e fetos, são as principais amostras utilizadas para o isolamento de *N. caninum* em cultura celular (Andreotti *et al.*, 2003). O isolamento de *Neospora* em cultura celular raramente é possível, uma vez que a maioria dos organismos morre quando as células do hospedeiro se tornam autolisadas (Dubey, 2004).

Na leitura dos frascos de cultura *in vitro*, a monocamada de células deve ser observada quanto à sua integridade, à presença de efeitos citopáticos como orifícios e destruição das

células hospedeiras infetadas e o aparecimento dos parasitas dentro das células ou livres no meio de cultura. Os taquizoítos são observados em pares ou em grupos nas células hospedeiras próximas às áreas de rutura da monocamada. Os protozoários localizam-se no citoplasma e, após romperem as células, aparecem em grupos de quatro a oito parasitas, ligados pela porção posterior. A reprodução de *N. caninum* em cultura celular ocorre por divisão binária. Após a inoculação das amostras de bovinos, os primeiros taquizoítos podem ser observados em diferentes períodos (após 15 dias, entre 29 a 34 dias, de 40 a 49 dias e 56 a 60 dias). Na cultura *in vivo*, primeiramente, as amostras de cérebro podem ser inoculadas nos *gerbils,* e após três a quatro meses, os seus cérebros, obtidos aquando da sua eutanásia, são processados e inoculados em cultura celular (Andreotti *et al.*, 2003).

1.2.8 Tratamento

Até ao momento, ainda não existem fármacos efetivos no tratamento de Neosporose bovina (Andreotti *et al.*, 2003).

Investigações em quimioterapia mostraram que o Toltrazuril pode retardar a disseminação de taquizoítos experimentalmente induzidos em murganhos e bezerros, mas requer o apoio da imunidade de células T para controlar a infeção. Investigações até ao momento sugerem que o tratamento com Toltrazuril tem um efeito parasitostático e não parasiticida, e não há evidências de que os bradizoítos sejam afetados pelo tratamento. O apicoplasto é um organelo essencial da maioria dos parasitas Apicomplexa, incluindo o *N. caninum*, que foi proposto como um alvo terapêutico potencial. Sabe-se que antibióticos antibacterianos, como o Cloranfenicol, a Clindamicina e a Azitromicina, atuam contra parasitas como o *Plasmodium* e o *Toxoplasma*. Esses fármacos inibem a síntese proteica de ribossomas procarióticos em vez de eucarióticos. Os apicoplastos possuem vias biológicas consideravelmente diferentes dos vertebrados. Isso significa que fármacos podem ser desenvolvidos para matar especificamente o apicoplasto, a fim de matar o parasita, sem efeitos colaterais para o hospedeiro (Goodswen *et al.*, 2013).

O tratamento químico apresenta limitações como o desenvolvimento de resistência aos fármacos pelo parasita, os riscos para a saúde humana através do consumo de carne e/ou leite com esses resíduos e a possibilidade de contaminação ambiental (Andreotti *et al.*, 2003).

1.2.9 Prevenção e controlo

Canada e colaboradores (2004) sugerem que a alta percentagem de fetos abortados positivos a Neosporose, bem como a alta percentagem de seropositividade em vacas, não apenas de efetivos leiteiros onde ocorreram surtos de aborto, mas também na população geral, verificadas em diversos estudos em diferentes países, incluindo Portugal, indicam claramente que o diagnóstico diferencial de Neosporose deve ser sempre considerado em casos de abortos esporádicos ou epidémicos, em explorações leiteiras portuguesas. Além disso, são necessárias modificações no controlo da doença do gado comercializado e nas técnicas de transferência de embriões aplicadas em vacas leiteiras em Portugal, para que a prevalência possa diminuir no nosso país.

Em explorações livres de *Neospora*, a prevenção da introdução do parasita através de medidas de biossegurança gerais, como por exemplo o controlo de vetores, a quarentena e rastreio de novos animais na exploração e a limpeza e desinfeção dos espaços, comedouros e bebedouros, é o foco principal no programa de prevenção de Neosporose (Haddad *et al.*, 2005).

Várias estratégias diferentes para o controlo de infeção e aborto por *N. caninum* em bovinos têm sido estudadas, como a não aplicação de qualquer alteração, a implementação de uma abordagem de teste e descarte para gado seropositivo, o tratamento com um parasiticida ou coccidiostático, o tratamento com outros fármacos (por exemplo, Toltrazuril) e a vacinação (Goodswen *et al.*, 2013).

Dubey (2003) confirmou que os procedimentos de transferência de embriões impedem a transmissão de *N. caninum* de vacas seropositivas para recetoras seronegativas e que embriões bovinos pré-implantados são resistentes à invasão de *N. caninum*. No entanto, a sua aplicação é restrita a bovinos de elevado mérito genético, nos quais o valor do futuro bezerro justificaria os elevados custos deste procedimento (Landmann *et al.*, 2002).

Os programas de controlo devem ter em conta a epidemiologia regional da Neosporose bovina e devem também incorporar o cálculo de custo-benefício, comparando as despesas de testes e medidas de controlo com o benefício da redução das perdas económicas devido à infeção e aborto por *N. caninum* (Reichel & Ellis, 2006).

Apesar de não prevenir a transmissão endógena de *N. caninum* ao feto, o uso de sémen bovino (preferencialmente de raça *Limousin* segundo Almería *et al.* (2009)) para inseminar vacas seropositivas para *N. caninum,* reduz o risco de aborto. Isto pode ocorrer devido ao efeito favorável do cruzamento de raças de carne com raças de leite, na saúde fetal e na função placentária. Além disso, esta técnica garante que as substituições de reprodutores de bovinos

infetados deixem de ocorrer, pois as fêmeas resultantes de cruzamentos de bovinos de carne e bovinos de leite, não são normalmente retidas para a produção de leite (Almería *et al.*, 2009).

Como referido anteriormente, *N. caninum* é eficientemente transmitido verticalmente em bovinos, por várias gerações. Portanto, atualmente, a combinação do abate ou refugo de animais positivos, a reposição do efetivo com animais seronegativos e a aplicação de testes de diagnóstico aos animais da exploração e aos animais em período de quarentena anterior à sua entrada na exploração, é a única forma atual de impedir, por motivos económicos, essa transmissão de mães para filhas (Dubey *et al.*, 2007). Como os animais de reposição representam um risco de reintrodução da doença na exploração, estes animais devem ser adquiridos de efetivos livres de *N. caninum*, com excelente desempenho reprodutivo e testados serologicamente na exploração de origem. Exigir também o teste das mães cujas filhas são potenciais compras, pode ajudar na identificação de indivíduos falso-negativos e evitar sistematicamente os animais de linhagens familiares nas quais o *N. caninum* é passível de ser transmitido verticalmente (Guido *et al.*, 2016).

No caso da existência de cães na exploração, algumas medidas práticas de controlo da infeção incluem a prevenção/limitação do acesso dos mesmos a áreas de pastagem, alimentação e abeberamento (Atkinson *et al.*, 2000; Dubey *et al.*, 2007). Também deve ser implementado o controlo regular de roedores, de modo a reduzir o risco potencial de infeção (Bartels *et al.*, 1999).

Testes serológicos podem ajudar no controlo da Neosporose no comércio internacional de animais, uma vez que animais infetados podem introduzir o parasita em explorações livres de doença, em áreas onde a doença não existe ou a sua prevalência é muito baixa (Dubey *et al.*, 2007).

Idealmente, a abordagem com melhor relação causa-efeito para controlo de Neosporose é a vacinação. Foi desenvolvida uma vacina comercial inativada, chamada NeoGuardTM, que foi apenas moderadamente bem-sucedida em testes de campo e foi posteriormente retirada do mercado. A vacina perfeita proporcionaria proteção contra a infeção, doença clínica e aborto, e isso implica que esta possa induzir uma resposta mediada por células não-fetopáticas, e permite discriminar entre animais infetados e vacinados. Vacinas vivas, baseadas em estirpes avirulentas de *N. caninum* isoladas de bovinos naturalmente infetados, mostraram-se promissoras nessa área. Um dos principais impedimentos para o registo dessas vacinas é o potencial dos parasitas em persistir no gado vacinado, levando a novas preocupações sobre a reversão à virulência. Além disso, não é fácil distribuir uma vacina de *N. caninum* viva

por meio de cadeias frias que não utilizam nitrogénio líquido para o armazenamento da vacina. Consequentemente, o desenvolvimento de outras abordagens vacinais torna-se agora imperativo, e uma área em que pouco esforço recente foi feito é o uso de vetores virais vivos para apresentar antigénios recombinantes. Foram identificados vários antigénios-alvo que podem ser dignos de avaliação para apresentação viral ao sistema imune do gado (Goodswen *et al.*, 2013).

Como é referido por Marugan-Hernandez (2017), a comunidade científica necessita de explorar a biologia de *Neospora caninum* para poder identificar novos potenciais imunógenos vacinais. Tendo em conta a relação parasita-hospedeiro em vacas gestantes, a vacinação deve ser efetuada antes da gestação para controlo da Neosporose (Nishikawa, 2017).

Para além disso, uma das principais formas de prevenção de infeção por *N. caninum* (maioritariamente em explorações em que a transmissão horizontal predomina) é o controlo dos fatores de risco. Alguns fatores que podem alterar o equilíbrio da imunidade durante a gestação, como o stress e desequilíbrios alimentares são difíceis de controlar (Bartels *et al.*, 1999).

1.2.10 Impacto económico

A Neosporose é uma doença protozoária de efetivos bovinos e outros ruminantes, com distribuição a nível mundial, que tem impacto na indústria mundial de gado, sendo associada a abortos endémicos e epidémicos, refugo involuntário de animais e diminuição da produção de leite em casos de efetivos leiteiros, causando assim enormes perdas económicas e ineficiência de produção (Canada *et al.*, 2004; Reichel *et al.*, 2013; Amdouni *et al.*, 2017).

Segundo Thurmond & Hietala (1996), em vacas seropositivas, a taxa de refugo/abate pode ser 1,43 a 1,7 vezes superior à das vacas seronegativas e dentro das positivas, as vacas que abortam têm ainda um risco 1,2 superior ao das que não abortam. Thurmond & Hietala (1997) verificaram também que vacas positivas a *Neospora* produzem aproximadamente 1 Kg a menos de leite que as negativas. Hernandez e colaboradores (2001) verificaram que a exposição a *N. caninum* causa um declínio de 3-4% na produção de leite, causando uma perda de 128 dólares por vaca por lactação. Pelo contrário, Hobson e colaboradores (2002) não verificaram qualquer associação entre a produção de leite e a seropositividade a *Neospora*.

Não existem dados firmes sobre as perdas económicas devidas à Neosporose na indústria pecuária em qualquer parte do Mundo, pois os estudos já efetuados utilizam apenas dados de algumas explorações como amostra. Porém as perdas são estimadas em milhões de dólares (Dubey, 2003).

Em todo o Mundo, esses abortos, nados-mortos e casos de doença neurológica por *N. caninum* são das principais causas de perdas económicas para as indústrias de laticínios e de carne bovina. A perda económica na maioria das explorações é estimada em 2-5% por ano, mas, ocasionalmente, a perda pode ser de 20% por ano em algumas explorações. Na Austrália, a perda anual é estimada em 100 milhões de dólares (Goodswen *et al.*, 2013).

Dubey (2003) refere que até 42% das vacas podem abortar devido à Neosporose e que o impacto económico dependerá do custo direto e do valor dos fetos perdidos. Os custos indiretos incluem ajuda profissional e custos associados ao estabelecimento de diagnóstico, *rebreeding,* possível perda de produção de leite e custos de substituição de vacas que abortaram e são refugadas/abatidas (Thurmond & Hietala, 1997). Globalmente, as perdas medianas estimadas devidas a abortos induzidos por *N. caninum* foram avaliadas em 1.298,3 milhões de dólares por ano, afetando tanto as indústrias de leite como de carne bovinos (Reichel *et al.*, 2013). Estima-se que, na Califórnia, cerca de 40.000 abortos podem ser causados por Neosporose, proporcionando uma perda estimada de 35 milhões de dólares por ano (Barr *et al.*, 1998). Na Austrália e na Nova Zelândia, acredita-se que os prejuízos sejam de mais de 100 milhões de dólares australianos, por ano (Reichel, 2000). Na Suíça, uma vez que a Neosporose é considerada uma doença de notificação obrigatória desde 2001, as perdas económicas em bovinos leiteiros foram estimadas em 9,7 milhões de euros por ano (Häsler *et al.*, 2006). No Canadá, a perda anual total foi estimada em 2.304 dólares por cada 50 vacas leiteiras (Chi *et al.*, 2002). Na Holanda, 76% dos rebanhos positivos a *Neospora* (sem aborto) não tiveram perdas económicas, enquanto que nos restantes 24%, as perdas económicas representam 2.000 euros por ano (Bartels *et al.*, 2006). No Brasil, as perdas económicas anuais na produção leiteira foram estimadas, em média, em 51,3 milhões de dólares. Na produção de carne bovina foram estimadas, em média, em 101 milhões de dólares (Schmidt *et al.*, 2018). Até à data, não existem estudos anteriores com referência a valores de impacto económico da Neosporose bovina em Portugal.

Embora a perda de bezerros devida ao aborto por *N. caninum* seja de importância económica, o número real de abortos em relação ao número de bezerros nascidos clinicamente normais (mas seropositivos) é pequeno. A questão óbvia que surge é o porquê de os abortos só ocorrem algumas vezes, se o parasita passa prontamente ao feto. Os motivos atuais propostos são a maturidade imunológica do feto quando infetados e a virulência da estirpe infetante (Dubey *et al.*, 2006).

Barling e colaboradores (2000) encontraram uma associação positiva entre o *status* de anticorpos anti-*N. caninum* dos vitelos e o ganho de peso, e projetaram uma perda de 15,62 dólares por bezerro.

As referências descritas acima, reforçam o impacto económico global que a infeção por *Neospora caninum* em bovinos representa em todo o Mundo.

1.3 Objetivos

Dubey (2005) demonstrou que, aquando do diagnóstico de abortos associados a *N. caninum* em bovinos leiteiros em todo o Mundo, 12 a 45% dos fetos abortados são infetados por este parasita protozoário, sendo relevante o seu impacto para as explorações. Vários estudos já realizados em Portugal têm demonstrado a presença deste parasita em diversas explorações. Tendo isto em conta, este estudo tem importância para a identificação, estudo da propagação e criação de protocolos de prevenção desta doença em Portugal.

Os principais objetivos deste estudo são:

1 identificar a prevalência de *Neospora caninum* na exploração Casal de Quintanelas;
2 verificar se a entrada ou saída de animais positivos para o tanque de leite se traduz em alguma alteração no nível de anticorpos anti-*Neospora caninum* no tanque de leite;
3 verificar se os animais apresentam diferentes valores nos anticorpos em diferentes fases de produção (parto, secagem e lactação);
4 verificar se há uma correlação de positividade entre mães e filhas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais e local experimental

O estudo realizou-se de 16 de Junho de 2018 a 06 de Novembro de 2018, numa exploração de bovinos leiteiros, denominada Casal de Quintanelas, situada em Pêro Pinheiro, Portugal. Esta exploração encontra-se dividida em duas áreas. Durante o período do estudo, a área da exploração em estudo tinha um efetivo de cerca de 330 bovinos adultos de raça *Holstein Friesian*, lactantes e não lactantes. Este número variou de 333 animais em Junho de 2018 a 327 animais em Novembro de 2018, tendo-se verificado a entrada de novos animais (por gestação) e saída de outros (por morte natural ou refugo/venda) nesse período. A outra área da exploração é referente a fêmeas jovens nulíparas.

Para este estudo foram incluídos todos os bovinos fêmeas, com aptidão leiteira, presentes na exploração referida acima. Estes foram divididos consoante o seu estado de produção (lactação, secagem e parto).

Quanto à história clínica pregressa dos animais avaliados, foram registados os seus partos normais, abortos e nados mortos, ocorridos até à data final do estudo, uma vez que os dois últimos acontecimentos são as consequências mais ocorridas e consideradas mais graves em bovinos adultos aquando da infeção por *N. caninum*. Por fim, foram registados também os números das respetivas mães de cada vaca analisada.

2.2 Delineamento experimental

No primeiro dia de visita à exploração, foram recolhidas amostras de sangue a vacas que se encontravam secas e amostras de leite às que se encontravam em lactação e ao tanque de leite. A cada 7 dias, foi feita uma nova visita à exploração em estudo e recolhidas amostras de leite de vacas que tenham entrado ou que iriam sair da fase de lactação. Nestes dias, também foram recolhidas novas amostras do tanque do leite.

2.3. Recolha das amostras

O sangue foi colhido da veia coccígea, com auxílio de uma agulha 18 Gauge para tubos secos devidamente identificados com o número da respetiva vaca. Posteriormente, estas amostras foram centrifugadas a 2500 rpm durante 15 minutos, de modo a retirar-se o soro sanguíneo e por fim este foi refrigerado. Relativamente às amostras de leite, recolheram-se

durante a ordenha para tubos secos. Estes também foram devidamente identificados com o respetivo número de cada vaca e refrigerados. Quanto às amostras do tanque de leite, estas foram recolhidas, semanalmente, do mesmo, para um tubo seco. Igualmente aos anteriores, estes foram devidamente identificados e posteriormente refrigerados.

2.4. Análise das amostras

Todas as amostras foram analisadas com recurso a um teste comercial de ELISA, no laboratório de parasitologia do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV), que se localiza em Oeiras, gentilmente cedido.

A preparação das amostras e reagentes, bem como o procedimento do teste, foram realizados de acordo com as instruções do kit utilizado (CIVTEST® BOVIS NEOSPORA – HIPRA). Para cada placa de amostras para o teste de ELISA, segundo indicações do fabricante, eram necessárias duas amostras de controlo positivo e duas de controlo negativo (igualmente fornecidos pelo fabricante). Como produto final do teste, obteve-se um valor de densidade ótica (DO) para cada amostra analisada, com auxílio de um espectrofotómetro. Para identificação de seropositividade/seronegatividade das amostras, foi aplicada a seguinte fórmula a cada valor de densidade ótica, de modo a obter um valor de IRPC (Índice Relativo x 100):

$$\text{IRPC} = \left[\frac{\text{DO}_{405}\text{amostra} - \text{média DO}_{405}\text{ controlo negativo}}{\text{média DO}_{405}\text{ controlo positivo} - \text{média DO}_{405}\text{ controlo negativo}}\right] \times 100$$

A interpretação dos valores de IRPC foi feita como indicado no teste ELISA utilizado (Tabela 5).

Tabela 5. Interpretação dos resultados do teste de ELISA. (Adaptado de CIVTEST® BOVIS NEOSPORA – HIPRA)

AMOSTRA DE SORO DO SANGUE INDIVIDUAL		**AMOSTRA DE LEITE INDIVIDUAL**	
Valor IRPC	**Estado imunitário contra *N. caninum***	**Valor IRPC**	**Estado imunitário contra *N. caninum***
Menor ou igual a 6,0	Negativo	Menor ou igual a 4,74	Negativo
Maior de 6,0 e inferior ou igual a 10,0	Suspeito	Maior de 4,74	Positivo
Maior de 10,0	Positivo		

AMOSTRA DE TANQUE DE LEITE	
Valor IRPC	**Prevalência de anticorpos contra *N. caninum* nos animais que contribuem para o tanque de leite**
Menor ou igual a 3,0	Inferior a 5 – 10%
Maior de 3,0	Superior a 10%

É importante referir que para que o teste seja considerado válido, foi necessário que se verificassem os seguintes critérios de validação:

- A média da DO dos controlos positivos ser superior a 0,9;
- A média da DO dos controlos positivos a dividir pela média da DO dos controlos negativos ser superior a 5,0.

2.3 Análise estatística

Para o armazenamento dos dados recolhidos foi utilizado o *software Microsoft* Excel 2016 e para a análise estatística recorreu-se ao *software* SPSS v20 (*Statistical Package for the Social Sciences*).

Recorreu-se ao teste Shapiro-Wilk por forma a verificar a normalidade da amostra.

De forma a averiguar a existência de diferenças entre as fases de produção foi realizado o Teste de Friedman. Posteriormente, com o intuito de detetar a correspondência dessas diferenças, utilizou-se o Teste post hoc de Wilcoxon, com correção de Bonferroni para comparações múltiplas. Neste teste, a variável IRPC foi utilizada como variável contínua.

Com a finalidade de verificar a existência de diferenças entre a percentagem de animais positivos nas fases de produção utilizou-se o teste não paramétrico Q de Cochran. Essas diferenças entre grupos foram encontradas através do Teste post hoc de Dunn com correção de Bonferroni para comparações múltiplas. Neste teste, a variável IRPC foi utilizada como variável dicotómica (positivo, negativo).

Na análise de correlação entre o valor de IRPC e a proporção de animais positivos em cada tanque utilizou-se a correlação de Spearman.

Para verificar a correlação entre a seropositividade das mães e respetivas filhas, utilizou-se o Teste de McNemar. Quanto à correlação da idade com a seropositividade a *Neospora caninum*, foi utilizado o Teste U de Mann Whitney. Por último, para observar a correlação entre a seropositividade a *Neospora caninum* e a ocorrência de aborto utlizou-se o Teste Chi-quadrado de independência.

3. RESULTADOS

3.1 Parâmetros demográficos

A amostra deste estudo incluiu 461 bovinos fêmeas, com aptidão leiteira, de raça *Holstein Friesian*. Estas foram divididas consoante o seu estado de produção, como descriminado na Tabela 6.

No primeiro dia do estudo, foram recolhidas 98 amostras de sangue, 333 amostras de leite individuais e duas amostras do tanque de leite. No total, foram recolhidas 743 amostras.

Tabela 6. Frequência absoluta e relativa de amostras de diferentes animais em cada fase de produção

		Lactação	Secagem	Parto
TOTAL 697 amostras	**N**	332	240	125
	%	47,63	34,43	17,94

Para além das amostras referidas na Tabela 6, 22 correspondem a amostras do tanque de leite e as restantes 24 amostras correspondem a repetições de teste de ELISA que foram realizadas durante o estudo.

Segundo o teste Shapiro-Wilk, não se verificou uma distribuição normal da amostra em estudo.

3.2 Diferenças no IRPC em diferentes fases de produção

Foi recolhida mais do que uma amostra, em diferentes fases de produção, a 181 dos 461 animais envolvidos no estudo. Foram detetadas diferenças significativas nos níveis de IRPC entre as fases de produção $\chi^2(2) = 28{,}500$, $p < {,}001$, em particular entre as fases de lactação e parto, $p < 0{,}001$ e entre as fases secagem e parto, $p = 0{,}004$. Na Tabela 7 apresentam-se alguns parâmetros estatísticos relativos ao valor de IRPC.

Tabela 7. Análise estatística do valor de IRPC para cada fase de produção

	Mediana	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
Lactação	-0,903	22,59	-7,731	85,185
Secagem	0,168	23,50	-7,297	91,233
Parto	7,697	21,48	-8,976	85,631

3.3 Diferenças na frequência relativa de animais positivos nas fases de produção

No total, dos 461 bovinos avaliados, 125 (27,1%) tiveram resultado positivo ao teste de ELISA para anticorpos contra *N. caninum*.

Foram detetadas diferenças significativas na percentagem de animais positivos a *N. caninum* nas diferentes fases de produção $\chi^2(2) = 24{,}261$, $p < {,}001$, em particular entre as fases de lactação e parto, $p < 0{,}001$ e entre as fases secagem e parto, $p > 0{,}001$. Na Tabela 8 apresentam-se alguns parâmetros estatísticos relativos ao número de animais positivos.

Tabela 8. Análise estatística dos animais positivos para cada fase de produção

	Frequência relativa	**Frequência absoluta**
Lactação	23,4%	34
Secagem	27,7 %	48
Parto	62,5%	60

3.4 Correlação de mães e filhas

Na Tabela 9 pode observar-se a frequência absoluta e relativa do resultado dos testes das mães e suas respetivas filhas. Não foram encontradas diferenças significativas na proporção de animais positivos e negativos a *N. caninum*, entre mães e filhas $\chi^2(1) = 0{,}205$, $p = 0{,}651$.

Tabela 9. Análise estatística da correlação de seropositividade de mães e filhas

		TESTE MAE								
		Negativo			Positivo			Total		
		Count	Row N %	Column N %	Count	Row N %	Column N %	Count	Row N %	Column N %
TESTE FILHA	Negativo	122	85,9%	83,6%	20	14,1%	41,7%	142	100,0%	73,2%
	Positivo	24	46,1%	16,4%	28	53,9%	58,3%	52	100,0%	26,8%
	Total	146	75,3%	100,0%	48	24,7%	100,0%	194	100,0%	100,0%

3.5 Teste ao tanque de leite

Para cada amostra de tanque de leite semanal, foram recolhidos os respetivos valores de IRPC, resultados do teste de ELISA e frequências relativas de animais positivos que contribuíram para o mesmo (Tabela 10).

Tendo em conta os valores presentes na Tabela 10, verifica-se que sempre que um tanque de leite é testado e se obtém um valor indicativo de que >10% do efetivo se encontra infetado com *Neospora caninum*, frequências relativas de animais positivos superiores a 10% foram sempre obtidas nas testagens individuais.

Tabela 10. Dados relativos às amostras semanais do tanque de leite

Nº TANQUE	RESULTADO TESTE	VALOR IRPC	PERCENTAGEM VACAS POSITIVAS TANQUE
1	>10%	34,16	19,40%
2	>10%	25,75	18,18%
3	>10%	25,59	17,70%
4	>10%	31,38	18,37%
5	>10%	31,18	17,77%
6	>10%	29,47	17,43%
7	>10%	26,63	18,40%
8	>10%	30,39	18,32%
9	>10%	26,76	18,07%
10	>10%	27,99	17,46%
11	>10%	29,64	16,12%
12	>10%	33,71	17,20%
13	>10%	27,18	17,87%
14	>10%	27,12	19,38%
15	>10%	23,11	17,63%
16	>10%	13,88	17,57%
17	>10%	20,82	20,42%
18	>10%	21	16,36%
19	>10%	20	18,73%
20	>10%	16,46	18,73%
21	>10%	20,61	15,92%
22	>10%	15,28	15,87%

3.6 Associação entre o valor IRPC e a proporção de animais positivos no tanque de leite

Verificou-se uma alteração nos valores de IRPC nas amostras semanais do tanque de leite. Esta variou de 34,16 na primeira recolha, do dia 14/06/2018, a 15,28, na última recolha, do dia 06/11/2018. Quanto à percentagem de vacas positivas a contribuir para o tanque, este variou de 19,4% a 15,87% nas datas referidas acima.

Não foi detetada uma associação estatisticamente significativa entre o valor de IRPC e a proporção de animais positivos a *N. caninum*, *rs*(20) = 0,103, p = 0,649.

3.7 Correlação da seropositividade com a idade dos animais

Os 461 bovinos fêmeas deste estudo tinham uma média de idades de cerca de 4 anos, variando de 1 a 10 anos. No Gráfico 1 é possível observar a distribuição de animais positivos e negativos a *N. caninum* de acordo com a sua idade. Verificou-se que não existe diferença estatisticamente significativa entre as idades de animais negativos (mediana = 46 meses) e positivos (mediana = 48 meses) ao teste de ELISA para anticorpos contra *N. caninum*, U = 21736,5, z = 0,312, p = 0,755.

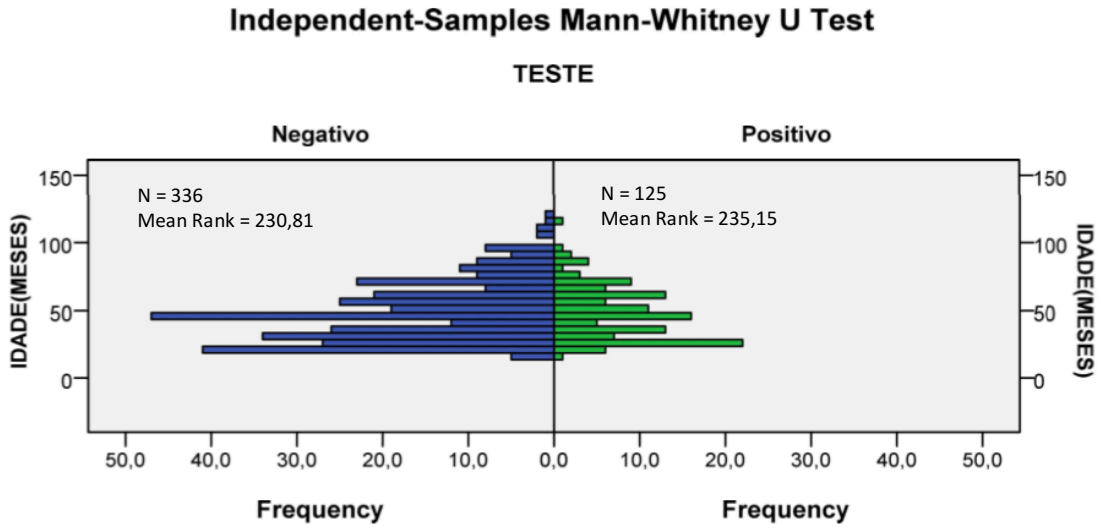


Gráfico 1. Distribuição de animais positivos e negativos a *N. caninum* de acordo com a sua idade

3.8 Correlação da seropositividade com a ocorrência de aborto

A história clínica pregressa dos animais avaliados, nomeadamente os seus partos normais, abortos e nados mortos estão registados na Tabela 11.

Tabela 11. Frequência absoluta de vacas de acordo com parâmetros relativos à sua história clínica pregressa

		Partos Normais									Abortos		Nados Mortos		
TOTAL 461 vacas		**0**	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**0**	**1**	**0**	**1**	**2**
	N	63	123	98	78	46	34	12	6	1	449	12	433	21	7
	%	13,7	26,7	21,3	16,9	9,9	7,4	2,6	1,3	0,2	97,4	2,6	93,9	4,6	1,5

Dentro dos abortos, dos 12 animais que apresentaram esta consequência reprodutiva, 7 (58%) são positivos a *Neospora caninum*. Relativamente aos nados mortos, dos 28 animais que apresentaram esta condição, 10 (35%) são positivos a *Neospora caninum*.

Dos 461 animais avaliados, 125 foram considerados positivos a *N. caninum* (27,1%). Destes, 107 não tinham história de abortos ou nados mortos (85,6%) (Gráfico 2).

Existe uma associação estatisticamente significativa entre a existência de anticorpos contra *N. caninum* e a ocorrência de aborto, $\chi 2(1) = 4{,}479$, $p = 0{,}034$, sendo esta associação muito fraca, $\varphi = 0.098$, $p = 0{,}039$.

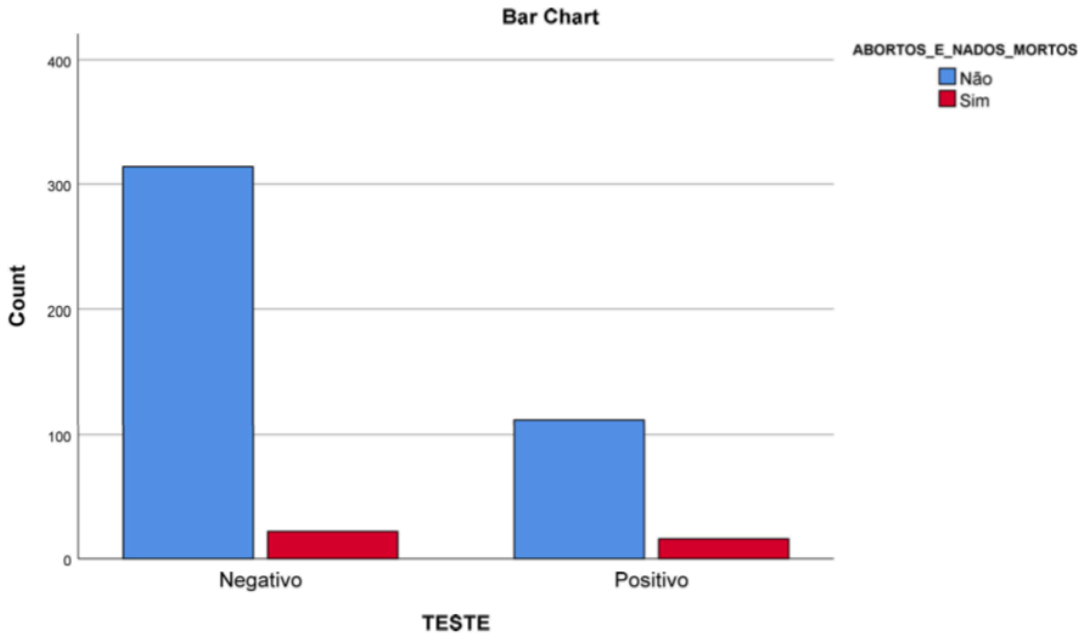


Gráfico 2. Frequência de abortos e nados mortos em animais positivos e negativos a *N. caninum*

4. DISCUSSÃO

4.1 Prevalência de Neosporose bovina

Na Tabela 12 encontram-se as prevalências de infeção por *N. caninum* estudadas em alguns países do Mundo, variando estas de 2,8% (bovinos de carne em Espanha) a 55,9% (bovinos de leite no México). Neste estudo, a prevalência de animais positivos a *Neospora caninum*, foi de 27,1%, estando dentro do intervalo referido acima.

Tabela 12. Prevalência média de *N. caninum* em bovinos de carne e de leite em alguns países. (Adaptado de (Reichel *et al.*, 2013)

País		Seroprevalência (%) - média
Argentina	Leite	22,2 (26,6-64,5)
	Carne	11,2 (4,7-20,3)
Austrália	Leite	10,9 (3,8-23,7)
Brasil	Carne	8,7 (2,5-14,9)
	Leite	16,1 (14,1-34,8)
Canadá	Carne	15,1 (9,5-16,7)
	Leite	12,0 (5,5-22,5)
México	Carne	11,3 (5,9-81,3)
	Leite	55,9 (42,0-59,0)
Holanda	Carne	11,6 (11,6-11,6)
	Leite	10,4 (9,9-10,8)
Nova Zelândia	Leite	30,4 (6,8-73,0)
Espanha	Carne	2,8 (2,8-2,8)
	Leite	19,1 (15,7-35,9)
Reino Unido	Carne	15,8 (7,4-25,1)
	Leite	15,0 (6,0-37,7)
Estados Unidos da América	Leite	49,2 (16,1-89,2)
	Carne	13,0 (7,5-81,7)

A Neosporose bovina foi diagnosticada pela primeira vez em Portugal em 2001 (Canada *et al.*, 2004). Canada e colaboradores (2004) verificaram uma prevalência de 28% e de 46% em dois grupos estudados, sem e com história de abortos, respetivamente, em animais provenientes de explorações das regiões norte e centro de Portugal. O valor obtido de 27,1% encontra-se próximo do intervalo ente as duas prevalências estudadas no nosso país.

Recentemente, Barbosa e colaboradoras (2019) verificaram a nível individual uma

prevalência de 16,3% de animais seropositivos em explorações pecuárias portuguesas. Contudo, a prevalência de animais seropositivos numa exploração, variou de 0% a 60,2%. Assim, o valor obtido no nosso estudo, volta a entrar-se dentro do intervalo já estudado.

Pode verificar-se que as prevalências são geralmente superiores em explorações leiteiras, quando comparadas com as de explorações de carne. Isto pode ser explicado pelo facto de o maneio intensivo ser um fator de risco para infeção por *N. caninum*.

Barbosa e colaboradores (2019) confirmaram ainda a disseminação da Neosporose entre as explorações leiteiras portuguesas, especialmente no norte do país, com a maioria das explorações infetadas (87,3%).

Contudo, comparações com outros estudos de prevalência de anticorpos anti-*N. caninum* devem ser feitos com precaução, considerando-se o uso de diferentes técnicas serológicas, idade ao abate, tamanho da amostra e tipo de população animal (Dubey *et al.*, 2007).

4.2 Protocolo utilizado

Segundo Dubey e colaboradores (2007) a deteção de anticorpos no soro e em amostras de leite individuais ou do tanque de leite por técnicas como o teste de imunofluorescência indireta e ELISA, são ótimos para a identificação de efetivos infetados por *N. caninum*. Estes autores, tal como Schares *et al.*, (2004), Bartels *et al.* (2005) e Guido *et al.* (2016) referem que em vacas leiteiras, o teste do soro, plasma ou leite individual de todo o efetivo e do tanque de leite deverá ser usado como uma ferramenta de baixo custo para monitorizar a seroprevalência. Posto isto, escolheu-se como tipo de amostra soro sanguíneo e leite, e o ELISA como teste diagnóstico a utilizar.

Porém, no leite, os anticorpos aparecem mais tarde e numa concentração mais baixa (cerca de 30 vezes menor) do que no soro (Dubey *et al.*, 2007). Neste estudo, foram recolhidas maioritariamente amostras individuais de leite e em menor quantidade amostras de soro sanguíneo, uma vez que para a obtenção destas últimas, o procedimento em causa é mais invasivo e stressante para os animais.

Dubey (2003) refere que embora o soro sanguíneo ou qualquer fluído corporal do feto possa ser usado para o diagnóstico serológico, o líquido peritoneal é melhor do que outros fluidos corporais. Contudo, não se optou por este tipo de amostra, visto que, mais uma vez, a obtenção destas é mais invasiva e também porque o kit de ELISA CIVTEST® BOVIS NEOSPORA – HIPRA apenas é válido para soro sanguíneo e leite. O teste de diagnóstico

escolhido, dentro dos ELISA disponíveis comercialmente, é um dos mais utilizados, uma vez que apresenta valores de sensibilidade e especificidade superiores a 95% (Barbosa *et al.*, 2019).

Estudos anteriores mostraram que o congelamento de amostras serológicas não tem uma influência apreciável nos níveis de anticorpos, embora os ciclos frequentes de congelamento e descongelamento possam diminuir os títulos de anticorpos no soro (Brey *et al.*, 1994). Os testes de ELISA realizaram-se com a maior brevidade possível após a recolha das amostras, de modo a que o seu resultado fosse o mais fiável possível. A maioria das amostras não sofreu qualquer tipo de processo de congelamento. Apenas algumas amostras sofreram um ciclo de congelamento, de forma a ser possível analisar todas as amostras do estudo com os reagentes e controlos disponíveis.

4.3 Titulação de anticorpos

Foram comparados os valores de IRPC de diferentes amostras (em diferentes fases de produção) para o mesmo animal, uma vez que Álvarez-García *et al.*, (2013) referem que ocorrem variações nos níveis de anticorpos durante a gestação nos bovinos fêmeas, o que pode influenciar o desempenho dos kits de ELISA. Neste estudo, também se verificaram variações no valor de IRPC em diferentes amostras para o mesmo animal, conforme descrito acima nos resultados.

Como já descrito anteriormente por Atkinson *et al.* (2000) e Andreotti *et al.* (2003), os bovinos naturalmente infetados podem sofrer uma variação considerável no título de anticorpos. Mazuz e colaboradores (2014) descobriram que vacas com baixo título de anticorpos (1: 200) durante a gestação podem tornar-se seronegativas, e podem tornar-se seropositivas no final da gestação, o que significa que em efetivos endémicos esse título representa um estado serológico instável, variável e não conclusivo. Neste estudo verificou-se, tal como na bibliografia referida acima, que a titulação de anticorpos aumenta no final da gestação (parto), como se pode verificar na Tabela 7. Os valores de IRPC das fases de lactação (-0,903) e secagem (0,168) correspondem a um resultado negativo para *Neospora caninum*, enquanto que o valor correspondente ao parto (7,697) equivale a um resultado positivo. O mesmo se pode verificar pela percentagem de animais positivos em cada fase, em que na fase de secagem (27,7%) e de lactação (23,4%) é inferior à do parto (62,5%). Isto, em conjunto com a observação detalhada dos dados obtidos, leva-nos a concluir que um grande número de vacas (21%), das 181 em que foram recolhidas amostras nas diferentes fases de produção, seroconverteram, tornando-se positivas no final da gestação, confirmando a hipótese de Mazuz

e colaboradores (2014). Essas elevações marcadas nos títulos de anticorpos estão associadas à transmissão vertical, que leva ao agravamento de uma infeção persistente, em que os bradizoítos se convertem em taquizoítos e se espalham pelo organismo do hospedeiro, aumentando as suas respostas imunes (Paré *et al.*, 1997).

Pelo contrário, houve dois casos (1,1%) em que se verificou seroconversão contrária (de positiva para negativa) nesse mesmo período. Esta pode explicar-se pela possibilidade de que em certos estádios da gestação os parasitas estejam escondidos e não sejam expostos à vigilância imunológica e, consequentemente, nenhuma resposta de anticorpos seja induzida, de modo a que animais serologicamente positivos anteriormente possam apresentar-se seronegativos (Paré *et al.*, 1997).

Para os casos em que é feita mais do que uma análise a um animal, o *gold standard* para o resultado de uma amostra, definido por von Blumröder e colaboradores (2004), é baseado na decisão da maioria dos testes. Se não existir maioria, ou seja, se houver um número igual de testes positivos e negativos, a amostra deve ser considerada positiva (von Blumröder *et al.*, 2004). Porém, alguns autores como Ortega-Mora e colaboradores (2006) indicam que devido às flutuações nos títulos de anticorpos em animais infetados, com a possibilidade de resultados falso-negativos, é aconselhável a repetição dos testes após um período de 4 a 6 semanas. Assim, nos bovinos em que se obteve pelo menos uma amostra positiva e uma outra negativa, deve aplicar-se esta repetição. Dos 56 animais em que se verificou esta situação, em 48 não se realizou essa nova repetição, enquanto que em apenas 8 foi efetuada, por motivos logísticos da exploração em estudo. Idealmente, nos 48 animais referidos deveria ter sido realizada essa repetição para confirmação do resultado.

Segundo Haddad e colaboradores (2005), tirar conclusões sobre o estado serológico efetivo de animais individuais com base numa única amostra pode levar a conclusões incorretas, podendo não refletir o seu estado de infeção, dada a potencial ocorrência de resultados falso-negativos, principalmente em explorações sem histórico de abortos por *N. caninum*. Estes referem que se deve então repetir a análise em gestações subsequentes para confirmar o resultado. Assim, também aos animais em que apenas se retirou uma amostra e que esta apresentou resultado negativo (228 dos 461 bovinos avaliados), deveria idealmente ter sido feita uma repetição do teste de ELISA. Porém, Andreotti e colaboradores (2003) afirmam que a avaliação serológica de todo o rebanho, juntamente com a avaliação da idade e pedigree, é válida para interpretar o estado serológico dos animais de forma individual e perceber qual o modo de transmissão de *N. caninum* na exploração.

Na observação detalhada dos resultados, verifica-se que, apesar das medianas referidas anteriormente, obtiveram-se valores de IRPC bastante elevados quando comparados com estas. O valor de IRPC mais alto obtido foi de 91,233. Segundo Andreotti e colaboradores (2003) a presença de títulos elevados de anticorpos nos bovinos sugere uma infeção recente por *N. caninum*.

Dubey e colaboradores (2007) afirmam que os níveis de anticorpos podem diminuir abaixo do *cut-off* após o aborto. Porém, segundo McAllister (2016) os bovinos podem apresentar altos níveis de anticorpos específicos anti-*N. caninum* após o aborto. Neste estudo, foram apenas presenciados dois casos de aborto, em que num deles, se verificou diminuição do valor de IRPC e no outro se verificou um aumento do mesmo, não sendo possível tirar conclusões sobre os mesmos.

4.4*Neospora caninum* no tanque de leite

A recolha semanal de amostras do tanque de leite teve como objetivo verificar a possível existência de variação no valor de IRPC, tentando concluir se, com a entrada ou saída de animais para o tanque de leite ocorria alteração significativa do valor de anticorpos neste.

Em explorações leiteiras, a deteção de anticorpos contra *N. caninum* no tanque de leite é uma ferramenta útil para fazer uma estimativa da seroprevalência dentro do efetivo (Bartels *et al.*, 2005).

A interpretação dos resultados obtidos para todas as amostras de tanque de leite foi que a prevalência de anticorpos contra *N. caninum* nos animais que contribuem para o tanque de leite foi superior a 10%. Confirmou-se esse resultado através da avaliação da frequência relativa real de animais positivos em cada tanque de leite.

Neste estudo, apesar de existir alteração no valor de IRPC com a entrada ou saída de animais para o tanque de leite, não foi detetada uma associação estatisticamente significativa entre o valor de IRPC e a proporção de animais positivos em cada tanque. Segundo o fabricante do kit de ELISA utilizado, dado que o volume de leite que contribui cada vaca para o tanque, o valor do resultado do teste de ELISA para o tanque é variável, e o valor da prevalência a partir da amostra de tanque de leite deve considerar-se apenas como estimativa. Também Guido e colaboradores (2016) referem que as concentrações de anticorpos no tanque de leite dependem, não só do número de animais sorologicamente positivos num efetivo, mas também da fase da lactação e da produção de leite. Embora vários testes de ELISA tenham sido adaptados para

amostras de tanque de leite, a sua sensibilidade é limitada, devendo estes ser aplicados apenas para fins de controlo e vigilância.

4.5Correlação de mães e filhas

Similarmente a Dubey e colaboradores (2007), Mazuz e colaboradores (2014) descobriram que cerca de 10% dos bezerros nascidos de mães seronegativas foram considerados seropositivos. Esse fenómeno pode estar associado a flutuações dos níveis de anticorpos abaixo do limite de deteção durante a gestação (gerando falso-negativos), mas também pode ser resultado de transmissão horizontal. Neste estudo, obtendo um valor de 16,4% de filhas seropositivas de mães seronegativas, podemos concluir o mesmo referido anteriormente. Pode ainda justificar-se com a ocorrência de falso-positivos nas amostras das filhas.

Quanto às mães positivas, como se pode verificar acima na Tabela 9, 41,7% das suas filhas são negativas a *N. caninum*. Existem relatos de que em bovinos persistentemente infetados, a transmissão vertical é mais eficiente em vacas mais jovens do que em vacas mais velhas, verificando-se uma diminuição da taxa de infeção com o aumento da paridade da mãe (Dubey, 2003). Essas mães positivas, em que as filhas foram negativas a *N. caninum*, tinham idades entre os 42 meses (3,5 anos) e os 88 meses (aproximadamente 7 anos). Assim, esta ocorrência pode então ter duas justificações:

- tal como ocorre na situação contrária referida acima, podem existir falso-positivos nas amostras das mães ou falso-negativos nas amostras das filhas;
- as mães podem ter sido infetadas após o parto das filhas avaliadas, sendo negativas aquando da respetiva gestação e no momento da análise serem positivas a *N. caninum*.

A diferença entre filhas positivas e negativas de mães positivas, apesar de não ser estatisticamente significativa, é clinicamente importante, uma vez que nos alerta para o facto da possível existência de um agente externo de infeção como fator de risco para a Neosporose bovina na exploração e para uma provável data aproximada para essa ocorrência.

Tal como ocorre na exploração estudada, a falta de uma associação entre a seropositividade de mães e filhas em efetivos infetados evidencia a ocorrência de infeção horizontal. (Dubey *et al.*, 2006).

Uma das limitações deste estudo foi o facto de algumas das mães de animais que entraram para o estudo já não se encontrarem na exploração e não ter sido realizada qualquer

análise para diagnóstico de Neosporose bovina nas mesmas anteriormente, o que nos deixou sem conhecimento sobre a sua seropositividade.

4.6Via de transmissão

Numa exploração, se a transmissão for predominantemente vertical, verifica-se o seguinte:

- as mães e as suas crias, bem como os bezerros pré-colostrais, são seropositivas;
- há uma distribuição uniforme de animais seropositivos entre os grupos etários;
- os abortos têm um padrão endémico (Dubey *et al.*, 2007).

Neste estudo, podemos verificar que a transmissão é maioritariamente vertical, pois 58,3% das mães positivas têm filhas positivas (Tabela 9), e que há uma distribuição uniforme de animais seropositivos entre os grupos etários, pois não se verificou uma diferença estatisticamente significativa de idades entre os animais positivos e negativos a *N. caninum.*

Por outro lado, em casos de transmissão horizontal, os animais seropositivos estão em aglomerados etários, não há associação entre o estado serológico das mães e dos seus filhos, e os abortos têm um padrão epidémico. Agrupamentos etários de bovinos seropositivos para *N. caninum* podem ter mães seronegativas ou descendentes seronegativos. A análise do histórico de alojamento e alimentação de grupos infetados pode ajudar a definir o período mais provável de infeção pós-natal (Dubey *et al.*, 2007).

Na exploração estudada, é necessário considerar também a existência de transmissão horizontal, uma vez que 46,1% das filhas positivas tinham mãe negativa (Tabela 9). Tendo em conta as causas mais comuns da origem da infeção nos casos de transmissão horizontal, questionou-se os proprietários da exploração sobre a existência canídeos, os quais negaram a sua existência. Pensa-se então que haja ou tenha havido o aparecimento de um cão errático positivo a *N. caninum* na exploração. Para além deste fator, é importante a monitorização de todos os fatores de risco para a infeção por *N. caninum* referidos na Tabela 3 para que se consiga minimizar ao máximo a ocorrência de transmissão horizontal.

4.7Idade dos animais

Os resultados descritos acima, juntamente com o Gráfico 1, indicam-nos que não existe uma faixa etária em que predominem animais positivos ou negativos, existindo assim uma distribuição uniforme de animais seropositivos entre os grupos etários.

Apesar da ocorrência de infeção horizontal em bovinos estar relacionada com a seropositividade crescente com a idade segundo Dubey e colaboradores (2006), esta não se verificou neste estudo.

4.8Aborto por *N. caninum*

Incidências de abortos entre 1 e 2% são consideradas normais em bovinos (Pegoraro *et al.*, 2009). Na exploração em estudo, apesar de pouco distante do intervalo referido, a frequência relativa de abortos foi de 2,6%, a qual já não se encontra dentro do intervalo referido acima, não sendo considerada normal. Assim, apesar de ser uma frequência relativa baixa, esta consequência reprodutiva deve ser considerada importante para o efetivo em estudo e devem ser tomadas medidas para a reduzir.

Das vacas que sofreram aborto, 58% são positivas a *Neospora caninum* e daquelas em que ocorreu o nascimento de nados mortos, 35% são positivas a *Neospora caninum*. Nestes casos, existe a possibilidade destes acontecimentos terem sido causados pela infeção em estudo. Contudo, essa associação não pode ser feita com certeza pois não foram realizados testes de diagnósticos aos fetos abortados e nados mortos para confirmação da infeção nestes. Para além disso, o aborto por Neosporose é considerado como multifatorial. Enquanto a infeção com o protozoário é necessária para *N. caninum* induzir aborto, a infeção por si só não é suficiente para causar aborto. Fatores como os níveis de anticorpos maternais durante a gestação, infeções virais, efeitos imunossupressores ou hereditários parecem contribuir para o risco de aborto em animais infetados com *N. caninum* (Paré *et al.*, 1997; Bartels *et al.*, 1999). Os restantes casos de aborto podem dever-se a variadas causas, como já descrito anteriormente.

Neste estudo, 85,6% dos animais positivos a *N. caninum* não tinham qualquer registo de abortos ou nados mortos. Tal como descrito por Paré *et al.* (1997) e Bartels *et al.* (1999), não é claro o motivo pelo qual bovinos fêmeas identificados como positivos a *N. caninum* antes da gestação não abortam.

A associação entre seropositividade e aborto e, consequentemente, o risco relativo, podem variar em relação ao teste serológico e ao valor de *cut-off* utilizados (Dubey *et al.*, 2007). Como já referido anteriormente, diversos estudos observaram uma associação entre a seroprevalência e o risco aumentado de aborto no efetivo. No entanto, nem todos os efetivos com alta seroprevalência sofrem de aborto associado a *N. caninum* (Paré *et al.*, 1998; Schares *et al.*, 2004). Neste estudo, tal como descrito na bibliografia referida, existe uma associação

estatisticamente significativa entre a existência de anticorpos contra *N. caninum* e a ocorrência de aborto, apesar de esta associação ser muito fraca.

4.9Controlo da infeção

Se *N. caninum* estiver presente num efetivo, pode esperar-se que a infeção seja mantida por gerações sucessivas, no caso de existir transmissão vertical, tal como é o caso deste estudo. Nesse caso, devem ser aplicadas estratégias seletivas de refugo/abate de animais infetados, podendo ser impraticável em efetivos com altos níveis de infeção, por ser economicamente inviável (Atkinson *et al.*, 2000). De igual forma, na exploração em estudo, a prevalência de animais positivos a *N. caninum* é elevada e em termos económicos é impraticável a eliminação de todos os bovinos infetados. A estratégia "teste e descarte" inclui as seguintes opções: testar e eliminar vacas seropositivas abortivas e não abortivas; testar e inseminar a descendência de mães seropositivas com sémen de bovinos de carne; testar e excluir da reprodução a descendência de mães seropositivas.

O teste de todo o efetivo da exploração e a exclusão de crias de mães seropositivas como potenciais substitutos proporcionaram o melhor retorno económico, em explorações com transmissão vertical predominantemente endógena. Também os animais excluídos devem ser apenas substituídos por animais seronegativos (Hall *et al.*, 2005). Comparada ao refugo, a reposição do efetivo com animais seronegativos representa uma alternativa de menor custo para a eliminação da infeção em médio prazo (Andreotti *et al.*, 2003). A fim de reduzir ou prevenir a transmissão vertical, no caso da exploração estudada, foi aconselhada, sempre que possível, a eliminação de animais positivos, preferencialmente aqueles que apresentavam valores de IRPC mais elevados. Por questões económicas, essa eliminação terá que ser gradual e não repentina como seria ideal. Advertiu-se ainda para a não utilização, sempre que possível, de animais positivos para reprodução ou para substituição de outros.

Quanto à transmissão horizontal, esta ocorre pela ingestão de oocistos esporulados libertados no meio ambiente, encontrados principalmente em água e/ou alimentos contaminados (Florencia *et al.,*2017; Olmo *et al.*, 2017). Assim, é de notar a importância da aplicação de um bom plano de maneio, biossegurança e vigilância, com a finalidade de evitar essa contaminação. Essa importância é reforçada pelo facto de mesmo baixos níveis de transmissão horizontal contribuírem para a manutenção da infeção dentro dos efetivos, uma vez que a transmissão transplacentária endógena é inferior a 100% e, portanto, sem outro tipo de

transmissão levaria a uma contínua diminuição da prevalência de infeção no efetivo (Dubey *et al.*, 2007).

Visto que *N. caninum* já foi encontrado em ratos e ratazanas segundo (Dubey J.P., 2003), provavelmente uma das profilaxias da doença seria também a aplicação de um programa de desratização, de forma a diminuir a propagação da doença.

Dado que existem diversos fatores de risco externos que influenciam o aparecimento e desenvolvimento da infeção por *N. caninum* numa exploração, já referenciados acima neste estudo, advertiu-se os proprietários para a possível existência dos mesmos e para a aplicação de medidas preventivas específicas para cada um destes, igualmente de modo a evitar a contaminação dos animais presentes. Como exemplos, refere-se o controlo de vetores, a limitação do acesso de animais alheios à exploração a pastagens e comedouros/bebedouros e a limpeza e desinfeção frequente e adequada destes últimos.

Barbosa e observadores (2019) observaram ainda que explorações com um menor número de animais têm prevalências baixas (0-3,1%) em comparação com explorações com um maior número de animais (7,5-60,2%). Assim, podemos presumir que com uma menor prevalência (menor número de animais) o controlo da Neosporose na exploração será mais rápido e mais fácil, comparativamente a explorações com um elevado número de bovinos seropositivos.

É importante ter em atenção que existem diferenças no risco de infeção entre diferentes regiões, dentro de uma determinada região e entre diferentes sistemas de maneio. Para além disso, existem diferenças nas técnicas serológicas utilizadas, no desenho do estudo e no tamanho da amostra utilizada. Portanto, deve ter-se cuidado ao comparar os resultados de uma análise de fator de risco com outra em que algumas variáveis são diferentes. A identificação repetida do mesmo risco ou fator de proteção em vários estudos, aumenta a evidência de que esse fator é um "verdadeiro" risco/fator de proteção para a infeção/doença em questão (Dubey *et al.*, 2007).

Os programas de controlo da Neosporose bovina baseiam-se no serodiagnóstico e no maneio do efetivo. Todos os animais devem ser monitorizados anualmente através do teste ELISA, principalmente os animais comprados, recém-nascidos e animais abortados, de forma a reduzir a prevalência no efetivo e detetar uma nova entrada do protozoário na exploração (Barbosa *et al.*, 2019). Também este programa de monitorização foi aconselhado aos responsáveis da exploração em estudo. Idealmente, com este programa, à semelhança de Barbosa e colaboradores (2019), é possível verificar se as medidas de prevenção e controlo da

infeção estão a ser efetuadas correta e eficazmente, e se necessário alterar as medidas a aplicar de acordo com os resultados obtidos.

5. CONCLUSÃO

A deteção de anticorpos no soro sanguíneo e leite individual ou no tanque de leite através do teste de ELISA, nomeadamente o kit comercial ELISA CIVTEST® BOVIS NEOSPORA – HIPRA, foi o método mais adequado para a identificação de efetivos infetados por *N. caninum*. A prevalência de Neosporose bovina na exploração Casal de Quintanelas foi de 27,1%, valor que se encontra próximo ou dentro dos intervalos já estudados anteriormente no nosso país. Verificaram-se variações no valor de IRPC em diferentes amostras para o mesmo animal, nomeadamente um aumento no final da gestação. Os valores de IRPC das fases de lactação e secagem corresponderam a um resultado negativo para *N. caninum*, enquanto que no parto equivaleu a um resultado positivo. O mesmo se verificou na percentagem de animais positivos em cada fase. Concluiu-se assim que um grande número de vacas seroconverteram, tornando-se positivas no final da gestação. Nas análises realizadas ao tanque de leite, a prevalência de anticorpos contra *N. caninum* nos animais que contribuem para o mesmo foi superior a 10%. Apesar de existir alteração no valor de IRPC com a entrada ou saída de animais para o tanque de leite, não foi detetada uma associação estatisticamente significativa entre este e a proporção de animais positivos em cada tanque. Verificou-se a existência de transmissão horizontal na exploração estudada pela falta de associação entre a seropositividade de mães e filhas e pela existência de filhas positivas de mães negativas. Verificou-se ainda que maioritariamente a transmissão é vertical pois mais de 50% das mães positivas tiveram filhas positivas. Observou-se ainda uma distribuição uniforme de animais seropositivos entre os grupos etários. A frequência relativa de abortos não foi considerada normal, mas apesar de ser um valor baixo, esta consequência reprodutiva deve ser considerada importante para o efetivo em estudo e devem ser tomadas medidas para a reduzir, tal como a adoção de medidas de prevenção da infeção.

As principais limitações deste estudo foram a não repetição de análises a animais com apenas uma amostra recolhida e o não conhecimento sobre o estado serológico para *N. caninum* de algumas mães de filhas estudadas. Contudo, os objetivos do estudo foram alcançados. De modo a dar continuidade, aconselha-se a reavaliação anual de todo o efetivo da exploração.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(OIE), W.O. (2013). *Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious*. Paris, France.

Álvarez-García, G., García-Culebras, A., Gutiérrez-Expósito, D., Navarro-Lozano, V., Pastor-Fernández, I. & Ortega-Mora, L. (2013). Serological diagnosis of bovine neosporosis: a comparative study of commercially available ELISA tests. *Veterinary Parasitology, 198*, 85–95.

Šlapeta, J., Koudela, B., Votýpka, J., Modrý, D., Horejs, R. & Lukes, J. (2002). Coprodiagnosis of Hammondia heydorni in dogs by PCR based amplification of ITS 1 rRNA: differentiation from morphologically indistinguishable oocysts of *Neospora caninum*. *Veterinary Journal, 163*, 147-154.

Almería, S. (2013). *Neospora caninum* and wildlife. *ISRN Parasitology, 13*.

Almería, S. & López-gatius, F. (2013). Bovine neosporosis: Clinical and practical aspects. *Research in Veterinary Science, 95*(2), 303–309.

Almería, S., López-Gatius, F., García-Ispierto, I., Nogareda, C., Bech-Sàbat, G., Serrano, B., Santolaria, P. &Yániz, J. (2009). Effects of crossbreed pregnancies on the abortion risk of *Neospora caninum*-infected dairy cows. *Vet Parasitol, 163*(4), 323-329.

Amdouni, Y., Rjeibi, M., Awadi, S., Rekik, M. & Gharbi, M. (2017). First detection and molecular indentification of *Neospora caninum* from naturally from naturally infected cattle and sheep in North Africa. *Transbound Emerg Dis., 65*(6), 1-7.

Anderson, M., Andrianarivo, A. & Conrad, P. (2000). Neosporosis in cattle. *Anim Reprod Sci, 60-61*, 417-431.

Anderson, M., Reynolds, J., Rowe, J., Sverlow, K., Packham, A., Barr, B. & Conrad, P. (1997). Evidence of vertical transmission of *Neospora* sp infection in dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc, 210*(8), 1169-1172.

Andreotti, R., Locatelli-Dittrich, R., Soccol, V. & Paiva, F. (2003). *Diagnóstico e Controle da Neosporose em Bovinos.* Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil: Embrapa.

Andrianarivo, A., Barr, B., Anderson, M., Rowe, J., Packham, A., Sverlow, K. & Conrad, P. (2001). Immune responses in pregnant cattle and bovine fetuses following experimental infection with *Neospora caninum*. *Parasitol. Res., 87*(10), 817-825.

Ansari-Lari, M., Rowshan-Ghasrodashti, A., Jesmani, H., Masoudian, M. & Badkoobeh, M. (2017). Association of *Neospora caninum* with reproductive performance in dairy cows: A prospective study from Iran. *Veterinary Research Forum, 8*(2), 109-114.

Antoniassi, N., Juffo, G., Santos, A., Pescador, C., Corbellini, L. & Driemeier, D. (2013). Causas de aborto bovino diagnosticadas no Setor de Patologia Veterinária da UFRGS de 2003 a 2011. *Pesquisa Veterinária Brasileira, 33*(2), 155-160.

Atkinson, R., Harper, P., Reichel, M. & Ellis, J. (2000). Progress in the Serodiagnosis of *Neospora caninum* Infections of Cattle. *Parasitology Today, 16*(3), 110-114.

Barbosa, A., Pereira, A. & Afonso, C. (2019). A seroprevalência de *Neospora caninum* em Explorações Pecuárias Portuguesas. *Revista Agros, 37*, 18-19.

Barling, K., McNeill, J., Thompson, J., Paschal, J., McCollum, F., Craig, T. & Adams, L. (2000). Association of serologic status for *Neospora caninum* with postweaning weight gain and carcass measurements in beef calves. *J Am Vet Med Assoc, 217*(9), 1356-1360.

Barr, B., Anderson, M., Dubey, J. & Conrad, P. (1991a). *Neospora*-like protozoal infections associated with bovine abortions. *Veterinary Pathology, 28*, 110-116.

Barr, B., Conrad, P., Dubey, J. & Anderson, M. (1991b). *Neospora*-like encephalomyelitis in a calf: pathology, ultrastructure, and immunoreactivity. *J Vet Diagn Invest, 3*, 39-46.

Barr, B., Dubey, J., Lindsay, D., Reynolds, J. & Wells, S. (1998). Neosporosis: its prevalence and economic impact. *Comp Cont Edu Pract Vet, 20*, 1-16.

Bartels, C., Hogeveen, H., van Schaik, G., Wouda, W. & Dijkstra, T. (2006). Estimated economic losses due to *Neospora caninum* infection in dairy herds with and without a history of *Neospora caninum* associated abortion epidemics. *SVEPM Ann Meet*, 191-201.

Bartels, C., van Maanen, C., van der Meulen, A., 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*(3-4), 235-246.

Bartels, C., Wouda, W. & Schukken, Y. (1999). Risk factors for *Neospora caninum* associated abortion storms in dairy herds in the Netherlands (1995 to 1997). *Theriogenology, 52*, 247-257.

Basso, W., Venturini, L., Venturini, M., Hill, D., Kwok, O., Shen, S. K. & Dubey, J. (2001a). First isolation of *Neospora caninum* from the feces of a naturally infected dog. *Journal of Parasitology, 87*, 612-618.

Basso, W., Venturini, L., Venturini, M., Moore, P., Rambeau, M., Unzaga, J., Campero, C., Bacigalupe, D. & Dubey, J. (2001b). Prevalence of Neospora caninum infection in dogs from beef-cattle farms, dairy farms, and from urban areas of Argentina. *Journal of Parasitology, 87*, 906-907.

Baszler, T., Gay, L., Long, M. & Mathison, B. (1999). Detection by PCR of *Neospora caninum* in Fetal Tissues from Spontaneous Bovine Abortions. *J Clin Microbiol, 37*(12), 4059-4064.

Bech-Sàbat, G., López-Gatius, F., Santolaria, P., García-Ispierto, I., Pabón, M., Nogareda, C. & Yaniz, J. A. (2007). Progesterone suplementation during mid-gestation icreases the risk of abortion in *Neospora*-infected dairy cows with high antibody titres. *Vet Parasitol, 145*(1-2), 164-167.

Bildfell, R., Davidson, J. & Dubey, J. (1994). *Neospora*-induced protozoal bovine abortion in Prince Edward Island. *Can Vet J, 35*(2), 122.

Bjerkâs, I., Mohn, S. F. & Presthus, J. (1984). Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Z. Parasitenkd, 70*(2), 271–274.

Bjorkman, C., Naslund, K., Stenlund, S., Maley, S., Buxton, D. & Uggla, A. (1999). An IgG avidity ELISA to discriminate between recent and chronic *Neospora caninum* infection. *J Vet Diagn Invest, 11*(1), 41–44.

Boas, R., Pacheco, A., Melo, A., de Oliveira, A., de Aguiar, D. & Pacheco, C. (2015). Infection by *Neospora caninum* in dairy cattle belonging to family farmers in the northern region of Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria, 24,*, 204–208.

Brey, R., Cote, S., McGlasson, D., Triplett, D. & Barna, L. (1994). Effects of repeated freeze–thaw cycles on anticardiolipin antibody immunoreactivity. *Am J Clin Pathol, 102*(5), 586–588.

Brownlie, J., Clarke, M. & Howard, C. (1989). Experimental infection of cattle in early pregnancy with a cytopathic strain of bovine virus diarrhoea virus. *Res. Vet. Sci., 46*, 307–311.

Cabell, E. (2007). Bovine abortion: aetiology and investigations In Practice. *In Practice, 29*, 455-463.

Cabral, A., Camargo, C., Galleti, N., Okuda, L., Pituco, E. & Fava, C. (2009). Diagnosis of *Neospora caninum* in bovine fetuses by histology, immunohistochemistry, and nested-PCR. *Rev Bras Parasitol Vet, 18*(4), 14-19.

Campero, L., Minke, L., Moré, G., Rambeaud, M., Bacigalupe, D., Moore, D., 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. *Revista Argentina de Microbiología, 47*, 295–301.

Campero, L., Moreno-Gonzalo, J., Venturini, M., 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-Garcia, G. (2017). 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*(1), 75-84.

Canada, N., Carvalheira, J., Meireles, C., da Costa, J. & Rocha, A. (2004). Prevalence of *Neospora caninum* infection in dairy cows and its consequences for reproductive management. *Theriogenology, 62*(7), 1229-1235.

Chi, J., VanLeeuwen, J., Weersink, A. & Keefe, G. (2002). Direct production losses and treatment costs from bovine viral diarrhea virus, bovine leukosis virus, *Mycobacterium avium* subspecies Paratuberculosis, and *Neospora caninum*. *Prev Vet Med, 55*(2), 137-153.

Collantes-Fernández, E., Arnáiz-Seco, I., Burgos, B., Rodriguez-Bertos, A., Aduriz, G., Fernández-García, A. & Ortega-Mora, L. (2006). Comparison of *Neospora caninum* distribution, parasite loads and lesions between epidemic and endemic bovine abortion cases. *Vet Parasitol, 142*(1-2), 187-191.

Corbellini, L., Driemeier, D., Cruz, C., Gondim, L. & Wald, V. (2002). Neosporosis as a cause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sul, southern Brazil. *Vet Parasitol, 103*(3), 195-202.

Corbellini, L., Pescador, C., Frantz, F., Wunder, E., Steffen, D., Smith, D. & Driemeier, D. (2006). Diagnostic survey of bovine abortion with special reference to *Neospora caninum* infection: importance, repeated abortion and concurrent infection in aborted fetuses in Southern Brazil. *Vet J, 172*(1), 114- 120.

de Marez, T., Liddell, S., Dubey, J., Jenkins, M. & Gasbarre, L. (1999). Oral infection of calves with *Neospora caninum* oocysts from dogs: humoral and cellular immune responses. *Int J Parasitol, 29*(10), 1647-1657.

de Meerschman, F., Focant, F., Boreux, R., Leclipteux, T., Losson, B. & Czaplicki, G. (2000). Cattle neosporosis in Belgium: a case-control study in dairy and beef cattle. *Inet J Parasitol, 30*, 887-890.

de Souza, S., Guimarães, J., Ferreira, F., Dubey, J. & Gennari, S. (2002). Prevalence of *Neospora caninum* antibodies in dogs from dairy cattle farms in Parana, Brazil. *Journal of Parasitology, 88*, 408-409.

Debierre-Grockiego, F., Campos, M., Azzouz, N., Schmidt, J., Bieker, U., Resende, M., Mansur, D.S., Weingart, R., Schmidt, R.R., Golenbock, D.T., Gazzinelli, R.T. & Schwarz, R. (2007). Activation of TLR2 and TLR4 by glycosylphosphatidylinositols derived from *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol. , 179*(2), 1129-1137.

Dijkstra, T., Barkema, H., Hesselink, J. & Wouda, W. (2002). Point source exposure of cattle to *Neospora caninum* consistent with periods of common housing and feeding and related to the introduction of a dog. *Veterinary Parasitology, 105*, 89-98.

Dijkstra, T., Eysker, M., Schares, G., Conraths, F., Wouda, W. & Barkema, H. (2001). Dogs shed *Neospora caninum* oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrum spiked with *Neospora caninum* tachyzoites. *International Journal for Parasitology, 31*, 747-752.

Donahoe, S., Lindsay, S., Krockenberger, M., Phalen, D. & Šlapeta, J. (2015). A review of neosporosis and pathologic findings of *Neospora caninum* infection in wildlife. *International Journal of Parasitology: Parasites and Wildlife, 4*, 216–238.

Dow, N., Chernick, A., Orsel, K., van Marle, G. & van der Meer, F. (2015). Genetic variability of bovine viral diarrhea virus and evidence for a possible genetic bottleneck during vertical transmission in persistently infected cattle. *PLoS One, 10*(7).

Dubey, J. (1999). Neosporosis in cattle: biology and economic impact. *J Am Vet Med Assoc, 214*, 1160-1163.

Dubey, J. (2003). Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *Korean J Parasitol, 41*(1), 1-16.

Dubey, J. (2004). Neosporosis. Em J. Coetzer, & R. Tustin, *Infectious Diseases in Livestock* (Vol. 1, pp. 382-393). Cape Town, South Africa: Oxford University Press.

Dubey, J. (2005). Neosporosis in cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract , 21*(2), 473-483.

Dubey, J. P. (2003). Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *The Korean Journal of Parasitology, 41*(1), 1–16.

Dubey, J. P. & Schares, G. (2011). Neosporosis in animals-the last five years. *Veterinary Parasitology, 180*, 90–108.

Dubey, J. P., Carpenter, J. L., Speer, C. A., Topper, M. J. & Uggla, A. (1988). Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association, 192*, 1269–1285.

Dubey, J. P., Hattel, A. L., Lindsay, D. S. & Topper, M. J. (1988). Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: Isolation of the causative agent and experimental transmission. *Journal of the American Veterinary Medical Association, 193*, 1259–1263.

Dubey, J. P., Janovitz, E. B. & Skowronek, A. J. (1992). Clinical neosporosis in a 4-week-old Hereford calf. *Vet. Parasitol, 43*, 137–141.

Dubey, J. & Lindsay, D. (1996). A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Vet Parasitol, 67*(1-2), 1-59.

Dubey, J. & Schares, G. (2006). Diagnosis of bovine neosporosis. *140*(1-2), 1-34.

Dubey, J., Barr, B., Barta, J., Bjerkås, I., Björkman, C., Blagburn, B., 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. & Lindsay, D. (2002). Redescription of *Neospora caninum* and its diferentiation from related coccidia. *Int J Parasitol, 32*, 929-946.

Dubey, J., Buxton, D. & Wouda, W. (2006). Pathogenesis of Bovine Neosporosis. *J. Comp. Path., 134*, 267-289.

Dubey, J., Carpenter, J., Speer, C., Topper, M. & Uggla, A. (1988). Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *J Am Vet Med Assoc, 192*, 1269–1285.

Dubey, J., Jenkins, M., Rajendran, C., Miska, K., Ferreira, L., Martins, J., Kwok, O. & Choudhary, S. (2011). Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for *Neospora caninum*. *Vet Parasitol, 181*(2-4), 382-387.

Dubey, J., Schares, G. & Ortega-Mora, L. (2007). Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. *Clin. Microbiol. Rev., 20*, 323–367.

Dubey, J., Sreekumar, C., Knickman, E., Miska, K., Vianna, M., Kwok, O., Hill, D.E., Jenkins, M.C., Lindsay, D.S. & Greene, C. (2004). Biologic, morphologic, and molecular characterisation of *Neospora caninum* isolates from littermate dogs. *International Journal for Parasitology, 34*, 1157-1167.

Ellis, W., O'Brien, J., Neill, S. & Hanna, J. (1982). Bovine leptospirosis: serological findings in aborting cows. *Vet. Rec. , 110*, 178–180.

Fioretti, D.P., Pasquai, 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. *Journal of Veterinary Medicine B, 50*, 399-404.

Fort, M., Edelsten, M., Maley, S., & Innes, E. (2015). Seroepidemiological study of *Neospora caninum* in beef and dairy cattle in La Pampa, Argentina. *Acta Parasitologica, 60*, 275–282.

Fortunado, M., Sá Guerreiro, D. & Stilwell, G. (2010). *Neospora caninum* como causa de aborto bovino em explorações leiteiras. *Revista Vaca Leiteira, 111*, 64-68.

Glynn, M. & Lynn, T. (2008). Brucellosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc. , 233*, 900–908.

Gondim, L., Lindsay, D. & McAllister, M. (2009). Canine and Bovine *Neospora caninum* Control Sera Examined for Cross-Reactivity Using *Neospora caninum* and *Neospora hughesi* Indirect Fluorescent Antibody Tests. *J Parasitol, 95*(1), 86-88.

Gondim, L., McAllister, M., Mateus-Pinilla, N., Pitt, W., Mech, L. & Nelson, M. (2005). Transmission of *Neospora caninum* between wild and domestic animals. *Journal of Parasitology, 90*, 1361-1365.

Gondim, L., McAllister, M., Pitt, W. & Zemlicka, D. (2004). Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol , 34*(2), 159-161 .

Goodswen, S., Kennedy, P. & Ellis, J. (2013). A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: From the past to the present. *Infect Genet Evol, 13*, 133-150.

Guido, S., Katzer, F., Nanjiani, I., Milne, E. & Innes, E. (2016). Serology-Based Diagnostics for the Control of Bovine Neosporosis. *Trends Parasitol, 32*(2), 131-143.

Häsler, B., Regula, G., Stärk, D., Sager, H., Gottstein, B. & Reist, M. (2006). Finantial analysis of various strategies for the control of *Neospora caninum* in dairy cattle in Switzerland. *Prev Vet Med, 77*(3-4), 230-253.

Haddad, J., Dohoo, I. & Van Leewen, J. (2005). A review of *Neospora caninum* in dairy and beef cattlea Canadian perspective. *Can Vet J, 46*(3), 230-243.

Hall, C., Reichel, M. & Ellis, J. (2005). *Neospora* abortions in dairy cattle: diagnosis, mode of transmission and control. *Vet Parasitol, 128*(3-4), 231- 241.

Hassig, M. & Gottstein, B. (2002). Epidemiological investigations of abortions due to *Neospora caninum* on Swiss dairy farms. *Vet Rec, 150*(17), 538-542.

Hernandez, J., Risco, C. & Donovan, A. (2001). Association between exposure to *Neospora caninum* and milk prodution in dairy cows. *J Am Vet Med Assoc, 219*(5), 632-635.

Hobson, J. D., Kelton, D., Lissemore, K., Hietala, S., Leslie, K., McEwen, B., Cramer, G. & Peregrine, A. (2002). *Neospora caninum* serostatus and milk production of Holstein cattle. *J Am Vet Med Assoc, 221*(8), 1160-1164.

Hobson, J., Duffield, T., Kelton, D., Lissemore, K., Hietala, S., Leslie, K., McEwen, B. & Peregrine, A. (2005). Risk factors associated with *Neospora caninum* abortion in Ontario Holstein dairy herds. *Veterinary Parasitology, 127*, 177-188 .

Hou, B., Houa, B., Bensonb, A., Kuzmicha, L., DeFranco, A. & Yarovinsky, F. (2011). Critical coordination of innate immune defense against *Toxoplasma gondii* by dendritic cells responding via their Toll-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 108*(1), 278-283.

Howe, L., West, D., Collett, M., Tattersfield, G., Pattison, R., Pomroy, W. E. & Williamson, N. B. (2008). The role of *Neospora caninum* in three cases of unexplained ewe abortions in the Southern North Island of New Zealand. *Small Ruminant Research,, 75*, 115–122.

Innes, E., Andrianarivo, A., Björkman, C., Williams, D. & Conrad, P. (2002). Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. *Trends Parasitol, 18*(11), 497-504.

Innes, E., Wright, S., Bartley, P., Maley, S., Macaldowie, C., Esteban-Redondo, I. Buxton, D. (2005). The host-parasite relationship in bovine neosporosis. *Vet. Immunol. Immunopathol, 108* (1,2), 29-36.

King, J., Slapeta, J., Jenkins, D., Al-Qassab, S., Ellis, J. & Windsor, P. (2010). Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol, 40*(8).

Landmann, J., Jillella, D., O'Donoghue, P. & McGowan, M. (2002). Confirmation of the prevention of vertical transmission of *Neospora caninum* in cattle by the use of embryo transfer. *Aust Vet J, 80*(8), 502-503.

Lanyon, S., Hill, F., Reichel, M. & Brownlie, J. (2014). Bovine viral diarrhoea: pathogenesis and diagnosis. *Vet. J., 199*.

Levett, P. (2001). Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Rev., 14*, 296–326.

Lindsay, D. & Dubey, J. (1989). Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. Am J Vet Res, 50(11), 1981-1983.

Lindsay, D.S., Dubey, J.P. & Ducan, R.B. (1999). Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. Vet Parasitol, 82(4), 327-333.

Lindsay, D., Upton, S. & Dubey, J. (1999). A structural study of the *Neospora caninum* oocyst. *International Journal for Parasitology, 29*, 1521-1523.

López-Gatiu, F., Pabón, M. & Almería, S. (2004). *Neospora caninum* infection does not affect early pregnancy in dairy cattle. *Theriogenology, 62*(3-4), 606-613.

Macedo, C., Macedo, M., Miura, A., Taroda, A., Cardim, S., Innes, E., Katzer, F., Cantón, G., Chianini, F., Headley, S. & Garcia, J. (2017). Occurrence of abortions induced by *Neospora caninum* in dairy cattle from Santa Catarina, southern Brazil. *Braz. J. Vet. Parasitol, 26*(3), 292-298.

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(3)*, 72-75.

Mansilla, F. & Capozzo, A. (2017). Apicomplexan profilins in vaccine development applied to bovine neosporosis. *Experimental Parasitology, 183*, 64-68.

Marugan-Hernandez, V. (2017). *Neospora caninum* and Bovine Neosporosis: Current Vaccine Research. *J Comp Path, 157*(2-3), 193-200.

Mats, H. T. & Bruce, W. C. (2015). Abortion. Em B. P. Smith, *Large Animal Internal Medicine* (5th ed., pp. 1350–1351). St. Louis: Mosby Elsevier.

Mazuz, M., Fish, L., Reznikov, D., Wolkomirsky, R., Leibovitz, B., Savitzky, I., Golenser, J. & Shkap, V. (2014). Neosporosis in naturally infected pregnant dairy cattle. *Vet Parasitol, 205*(1-2), 85-91.

McAllister, M. (2016). Diagnosis and control of bovine neosporosis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, 32*, 443–463.

McAllister, M., Dubey, J., Lindsay, D., Jolley, W., Wills, R. & McGuire, A. (1998). Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol, 28*(9), 1473-1478.

McAllister, M., Huffman, E., Hietala, S., Conrad, P., Anderson, M. & Salman, M. (1996). Evidence suggesting a point source exposure in an outbreak of bovine abortion due to neosporosis. *J Vet Diagn Invest, 8*, 355-357.

McGarry, J., Stockton, C., Williams, D., & Trees, A. (2003). Protracted shedding of oocysts of *Neospora caninum* by a naturally infected foxhound. *Journal of Parasitology, 89*, 628-630.

Moore, D. (2005). Neosporosis in South America. *Veterinary Parasitology, 127*, 87–97.

Moore, D., Campero, C., Odeón, A., Posso, M., Cano, D., Leunda, M., Basso, W., Venturini, M. & Späth, E. (2002). Seroepidemiology of beef and dairy herds and fetal study of *Neospora caninum* in Argentina. *Vet Parasitol, 107*(4), 303-316.

Moraveji, M., Hosseini, A., Moghaddar, N., Namavari, M. & Eskandari, M. (2012). Development of latex agglutination test with recombinante NcSAG1 for the rapid detection of antibodies to *Neospora caninum* in cattle. *Veterinary Parasitology, 189*, 211–217.

Moreno, B., Collantes-Fernandez, 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. *Veterinary Parasitology, 187*, 312–318.

Nampanya, S., Young, J., Bush, R., Windsor, P. & Khounsy, S. (2014b). The food security challenge for the Buffalo meat industry: perspectives from lao PDR. *J. Buff. Sci., 3*, 38.

Nematollahi A, M. G., Jaafari, R., Ashrafi Helan, J. & Norouzi, M. (2013). Study on outbreak of *Neospora caninum*-associated abortion in dairy cows in Tabriz (Northwest Iran) by serological, molecular and histopathologic methods. *Asian Pacific J Trop Med, 6*, 942-946.

Newcomer, B., Toohey-Kurth, K., Zhang, Y., Brodersen, B., Marley, M., Joiner, K., Zhang, Y., Galik, P., Riddell, K. & Givens, M. (2014). Laboratory diagnosis and transmissibility of bovine viral diarrhea virus from a bull with a persistent testicular infection. *Vet. Microbiol, 170*, 246–257.

Nishikawa, Y. (2017). Towards a preventive strategy for neosporosis: challenges and future prespectives for vaccine development against infection with *Neospora caninum*. *J Vet Med Sci, 79*(8), 1374-1380.

Nogareda, C., López-Gatius, F., Santolaria, P., Garcia-Ispierto, I. B.-S., Pablón, M., Mezo, M., Gonzalez-Warleta, M., Castro-Hermida, J., Yániz, J. & Almeria, S. (2007). Dynamics of anti-*Neospora caninum* antibodies during gestation in chronically infected dairy cows. *Vet Parasitol, 148*, 193-199.

O'Toole, D. & Jeffrey, M. (1987). Congenital sporozoan encephalomyelitis in a calf. *Vet Rec, 121*, 563-566.

Olmo, L., Dye, M., Reichel, M., Young, J., Nampanya, S., Khounsy, S., Thomson, P., Windsor, P. & Bush, R. (2017). Investigation of infectious reproductive pathogens of large ruminants: Are neosporosis, brucellosis, leptospirosis and BVDV of relevance in Lao PDR? *Elsevier, 177*, 118-126.

Orlando, D., Costa, R., Soares, B., Oliveira, N., Nascimento, L., Peconick, A., Raymundo, D. & Varaschin, M. (2013). *Neospora caninum* abortions in cattle in southern Minas Gerais, Brazil. *Pesq Vet Bras, 33*(11), 1332-1338.

Ortega-Mora, L., Fernández-García, A. & Gómez-Bautista, M. (2006). Diagnosis of bovine neosporosis: recent advances and perspectives. *Acta Parasitologica, 51*, 1–14.

Ould-Amrouche, A., Klein, F., Osdoit, C., Mohamed, H., Touratier, A., Sanaa, M. & Mialot, J. (1999). Estimation of *Neospora caninum* seroprevalence in dairy cattle from Normandy, France. *Veterinary Research, 30*, 531-538.

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., Thurmond, M. & Hietala, S. (1997). *Neospora caninum* antibodies in cows during pregnancy as a predictor of congenital infection and abortion. *J Parasitol, 83*(1), 82-87.

Parish, S., Maag-Miller, L., Besser, T., Weidner, J., McElwain, T., Knowles, D. & Leathers, C. (1987). Myelitis associated with protozoal infection in newborn calves. *J Am Vet Med Assoc, 191*, 1599-1600.

Pegoraro, L., Saalfeld, M., Weissheimer, C. & Vieira, A. (2009). *Manejo Reprodutivo em Bovinos de Leite.* Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil: Embrapa.

Pena, H. F., Soares, R. M., Ragozo, A. M., Monteiro, R. M., Yai, L. E., Nishi, S. M. & Gennari, S. M. (2007). Isolation and molecular detection of *Neospora caninum* from naturally infected sheep from Brazil. *Veterinary Parasitology, 147*, 61–66.

Pescador, C., Corbellini, L., Oliveira, E., Raymundo, D. & Driemeier, D. (2007). Histopathological and immunohistochemical aspects of *Neospora caninum* diagnosis in bovine aborted fetuses. *Vet Parasitol, 150*(1-2), 159- 163.

Peters, M., Luotkefels, E., Heckeroth, A. & 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.

Pfeiffer, D., Williamson, N., Reichel, M., Wichtela, J. & Teague, W. (2002). A longitudinal study of *Neospora caninum* infection on a dairy farm in New Zealand. *Prev Vet Med, 54*, 11-24.

Plattner, F., Yarovinsky, F., Romero, S., Didry D., Carlier, M., Sher, A. & Soldati-Favre, D. (2008). *Toxoplasma* profilin is essential for host cell invasion and TLR11-dependent induction of an interleukin-12 response. *Cell Host Microbe, 3*(2), 77-87.

Quintanilla-Gozalo, 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.

Razmi, G., Maleki, M., Farzaneh, N., Talebkhan Garoussi, M. & Fallah, A. (2007). First report of *Neospora caninum*-associated bovine abortion in Mashhad area, Iran. *Parasitol Res, 100*, 755-757.

Regidor-Cerrillo, J., Arranz-Solís, D., Benavides, J., Gómez-Bautista, M., Castro-Hermida, J., Mezo, M., Pérez, V., Ortega-Mora, L. & 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*(1).

Reichel, M. (2000). *Neospora caninum* infections in Australia and New Zealand. *Aust Vet J, 78*(4), 258-261.

Reichel, M. & Ellis, J. (2006). If control of *Neospora caninum* infection is technally feasible does it make economic sense? *Vet Parasitol, 142*(1-2), 23-34.

Reichel, M., Alejandra Ayanegui-Alcerreca, M., Gondim, L. & Ellis, J. (2013). What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle - The billion dollar question. *International Journal for Parasitology, 43*, 133–142.

Reichel, M., Moore, D., Hemphill, A., Ortega-Mora, L., Dubey, J. & Ellis, J. (2015). A live vaccine against *Neospora caninum* abortions in cattle. *Vaccine, 33*, 1299–1301.

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. *Veterinary Parasitoogy, 128*, 219-230.

Rodrigues, A., Gennari, S., Aguiar, D., Sreekumar, C., Hill, D., Miska, K., Vianna, M. & Dubey, J. (2004). Shedding of *Neospora caninum* oocysts by dogs fed tissues from naturally infected water bujjaloes (Bubalus bubalis) from Brazil. *Veterinary Parasitology, 124*, 139-150.

Romero, J. P. (2002). Factors associated with *Neospora caninum* serostatus in cattle of 20 specialised Costa Rican dairy herds. *Prev Vet Med, 53*(4), 263–273.

Santos, A., Navarro, I., Freire, R. & Vidotto, O. (2005). *Neospora caninum* in dairy cattle in Paraná State, Brazil: histological and immunohistochemical analysis in fetuses. *Semina: Cienc Agrar, 26*(4), 559-562.

Sawada, M., Park, C., Kondo, H., Morita, T., Shimada, A., Yamane, I. & Umemura, T. (1998). Serological survey of antibody to *Neospora caninum* in Japanese dogs. *Journal of Veterinary Medical Science, 60*, 853-854.

Schares, G., Barwald, A., Staubach, C., Ziller, M., Klöss, D., Schröder, R., Labohm, R., Dräger, K., Fasen, W., Hess, R. & Conraths, F. (2004). Potential risk factors for bovine *Neospora caninum* infection in Germany are not under the control of the farmers. *Parasitology, 129*, 301-309.

Schmidt, A., T.A., P., Barddal, J., Oliveira, A., de Aguiar, D., Negreiros, R. & Pacheco, R. (2018). Seroprevalence, spatial analysis and risk factors of infection with *Neospora caninum* in cattle in Brazil's northern Pantanal Wetland. *Braz J Vet Parasitol, 27*(4), 455-463.

Silva, M., Almeida, M., Mota, R., Pinheiro-Junior, J. & Rabelo, S. (2008). Fatores de risco associados à infeção por *Neospora caninum* em matrizes bovinas leiteiras em Pernambuco. *Cienc Anim Bras, 9*(2), 455-461.

Takeuchi, O. & Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell, 140*(6), 805-820.

Taylor, M., Coop, R. & Wall, R. (2013). Veterinary parasitology. *Wiley, Chicester, Vongxay.*

Thurmond, M. & Hietala, S. (1996). Culling associated with *Neospora caninum* infection in dairy cows. *Am J Vet Res, 57*, 1559-1562.

Thurmond, M. & Hietala, S. (1997a). Effect of congenitally acquired *Neospora caninum* infection on risk of abortion and subsequent abortions in dairy cattle. *J Vet Res, 58*, 1381-1385.

Thurmond, M. & Hietala, S. (1997b). Effect of *Neospora caninum* infection on milk production in first-lactacion dairy cows. *J Am Vet Med Assoc, 210*(5), 672-674.

Trees, A. & Wiliams, D. (2005). Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Trends Parasitol, 21*(12), 558-561.

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*(2), 280-283.

von Blumröder, D., Schares, G., Norton, R., Williams, D., Esteban-Redondo, I., Wright, S., Björkman, C., Frössling, J., Risco-Castillo, V., Fernández-García, A., Ortega-Mora, L., Sager, H, Hemphill, A., vaan Maanen, C., Wouda, W. & Conraths, F. (2004). Comparison and standardisation of serological methods for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in bovines. *Vet Parasitol, 120*(1-2), 11-22.

Wallach, M., Ashash, U., Michael, A. & Smith, N. (2008). Field application of a subunit vaccine against an enteric protozoan disease. *PLoS One , 3*(12), 1-7.

Wouda, W. (2000). Diagnosis and epidemiology of bovine neosporosis: a review. *Vet Q, 22*(2), 71-74.

Wouda, W., Dijkstra, T., Kramer, A., Van Maanen, C. & Brinkhof, J. (1999). Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infections in dogs and cattle. *International Journal for Parasitology, 29*, 1677-1682.

Yarovinsky, F. & Sher, A. (2006). Toll-like receptor recognition of *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol., 36*(3), 255-259.