



ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Seroprevalência de *Neospora caninum* numa exploração de bovinos de leite na região Norte de Portugal Continental

José Pedro da Silva Quaresma

Coimbra, julho de 2023



ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**Seroprevalência de *Neospora caninum* numa exploração de bovinos de leite
na região Norte de Portugal Continental**

Coimbra, julho de 2023

José Pedro da Silva Quaresma

Mestrado integrado em Medicina Veterinária

Constituição do Júri

Presidente do Júri: Professora Doutora Liliana
Cristina Pereira Montezinho

Arguente: Doutora Helga Waap

Orientador: Professor Doutor Sérgio Sousa

Orientador Interno

Professor Doutor Sérgio Sousa

Coorientadores Internos

Mestre Ricardo Cabeças

Professor Doutor Gonçalo Frouco

Orientador Externo

Dr. Paulo Capêlo

CapêloVet

Agradecimentos

A realização deste trabalho envolveu a contribuição de diversas entidades e instituições, sem as quais não teria sido possível concluir a jornada a que me propus há seis anos. A elas estou agradecido, não só por me terem permitido a obtenção de resultados palpáveis, como também me terem auxiliado na resolução de todas as dificuldades com que me deparei. Nesse sentido, acho essencial deixar um sinal de gratidão a cada uma das entidades que se envolveram neste caminho, tendo dispensado não somente tempo e auxílio, mas também incentivo e perseverança.

À EUVG – Escola Universitária Vasco da Gama – deixo o meu agradecimento. Agradeço a uma instituição que me proporcionou seis anos de ensinamentos, uma Escola que me facultou novas competências e me tornou capaz de enfrentar novos desafios. Agradeço, assim, a uma instituição que me permitiu o contacto direto com objetos de estudo, que me disponibilizou recursos bibliográficos contendo dados e materiais de pesquisa essenciais, e me permitiu o uso das suas instalações e infraestruturas, fornecendo um ambiente de estudo calmo e agradável. É com enorme orgulho que deixo uma palavra de obrigado aos meus amigos que caminharam comigo ao longo desta caminhada. Aos amigos da faculdade, agradeço à Manuela Jorge, à Rita Sousa, à Sofia Quinteiro, ao Tomás Vaz e, por fim, à pessoa mais importante que a faculdade me deu a conhecer: Obrigado, Telma. Contudo, não foram apenas os amigos da faculdade que estiveram ao meu lado. Nesse sentido, agradeço ao Pedro Pinto, ao meu primo Bernardo Ferreira, ao Pedro Santos e ao Joel Prior, amigos de longa data, que nunca estiveram ausentes quando mais precisei.

Ao Dr. Paulo Capêlo, orientador externo, deixo o meu sincero obrigado. Agradeço não só pela oportunidade de estagiar na CapêloVet, Lda., mas também por meter permitido o contacto direto com a rotina diária de uma equipa de médicos veterinários de espécies pecuárias, o que se relevou muito útil nos termos da minha formação. Agradeço, também, toda a dedicação e paciência por me acolher e ensinar sempre com boa-disposição e tranquilidade. Não poderia deixar de dar uma palavra de reconhecimento aos colegas André e João pela amizade e entreajuda que me proporcionaram ao longo dos meses de estágio.

Aos meus coorientadores internos, professor Gonçalo Frouco e professor Ricardo Cabeças, agradeço-vos todas as ideias, correções, advertências e ajudas ao longo da elaboração da dissertação. Por fim, no capítulo dos orientadores interno, resta-me agradecer à pessoa mais importante no desenvolvimento deste trabalho. Agradeço, assim, ao professor Sérgio Sousa pelo companheirismo, amizade e auxílio ao longo destes meses. Aproveito para afirmar toda admiração pela pessoa que se revelou ser, não apenas como um excelente profissional, mas também como um grande amigo. O meu muito obrigado, professor Sérgio Sousa.

Devo um profundo agradecimento à minha família. Agradeço à minha irmã Francisca, ao meu cunhado Márcio, ao meu irmão Joca, à minha cunhada Teresa e aos meus sobrinhos (Miguel, Gustavo, Carolina e Sofia). Neste capítulo, tenho também o dever de deixar uma palavra de amabilidade aos meus queridos avós maternos avó Lídia e avô Leonel e aos avós paternos avó Lília e avô José. Agradeço, também, ao meu primo Varito e aos meus padrinhos (tia Irene, tio Júlio, Guida e Toni), pessoas pelo qual tenho elevado sentimento de estima e admiração. Não poderia deixar de lembrar todos os telefonemas, as palavras de carinho e palavras de incentivo ao longo deste percurso.

Devo, ainda, um agradecimento especial ao Professor Doutor Fernando Delgado, pela surpresa de se ter revelado uma pessoa excecional e um profissional exímio. Não só vou recordar com apreço todo o todos os ensinamentos que me transmitiu ao longo da minha primeira licenciatura, como também tenho comigo desde então um enorme sentimento de amizade e admiração. Tornou-se uma pessoa que, não somente estimo, como admiro. Se hoje aqui estou a concluir o meu percurso em Medicina Veterinária, também se deve ao seu incentivo.

Por fim, e ainda mais importante, resta-me deixar o meu infinito agradecimento aos meus pais. Levarei sempre comigo todos os valores e princípios que me foram transmitidos até hoje. Convosco aprendi o verdadeiro significado de espírito de sacrifício e aprendi o que significa abdicar do nosso espaço de conforto com o objetivo de procurar novas oportunidades. Não podendo prometer que serei um profissional exímio, tenho obrigação de prometer que me dedicarei à profissão com toda a ética e integridade, procurando sempre honrar o nome da nossa família.

O vosso exemplo de vida estará sempre presente em mim. Ser-vos-ei eternamente agradecido.

Índice geral

1.	Introdução	3
2.	Materiais e Métodos	4
2.1.	Caracterização do local do estudo e colheita de amostras	4
2.2.	Teste serológico	5
2.3.	Dados recolhidos – avaliação dos parâmetros produtivos e reprodutivos	5
2.4.	Análise estatística.....	5
3.	Resultados	5
3.1.	Seroprevalência de <i>Neospora caninum</i> na exploração	5
3.2.	Resultados da estatística descritiva dos parâmetros produtivos e reprodutivos	6
3.3.	Resultados dos parâmetros avaliados estatisticamente	7
4.	Discussão	7
5.	Conclusão	10
6.	Referências bibliográficas	11

Índice de tabelas

Tabela 1: Animais seropositivos a <i>Neospora caninum</i> na exploração.	6
Tabela 2: Parâmetros produtivos e reprodutivos da exploração.	6
Tabela 3: Parâmetros produtivos e reprodutivos avaliados estatisticamente.	7

Lista de abreviaturas

°C – graus Celsius

BVD – *Bovine viral diarrhea* (Diarreia Viral Bovina)

CI – Intervalo de Confiança

ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (Ensaio por Imunoabsorção Enzimática)

IA – Inseminação Artificial

IBR – *Infectious bovine rhinotracheitis* (Rinotraqueíte Infeciosa Bovina)

IEP – Intervalo entre partos

IgG – Imunoglobulina G

mL – Mililitros

mm – Milímetros

nm – Nanómetro

OD – *Optical density* (Densidade Ótica)

OR – *Odd Ratio*

PCR – *Polymerase chain reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

TMR – *Total Mixed Ration*

Seroprevalência de *Neospora caninum* numa exploração de bovinos de leite na região Norte de Portugal Continental

José Quaresma¹, Paulo Capêlo², Ricardo Cabeças¹, Gonçalo Frouco¹, Sérgio Sousa¹

¹ Centro de Investigação Vasco da Gama (CIVG), Escola Universitária Vasco da Gama, Av. José R. Sousa Fernandes 197, Campus Universitário- Bloco B, Lordemão, 3020-210, Coimbra, Portugal (jpquaresma12@hotmail.com; ricardo.cabecas@euvg.pt; goncalo.frouco@euvg.pt; sergio.sousa@euvg.pt)

² CapêloVet, Rua Santo António nº161 Gual, Barcelos, Portugal (capelovet.empresa@gmail.com)

Resumo

Neospora caninum é um parasita protozoário intracelular obrigatório que causa perdas reprodutivas e produtivas, sendo responsável por elevadas perdas económicas em bovinicultura. Este estudo foi desenvolvido no sentido de estudar a seroprevalência de *N. caninum* e a sua influência nos parâmetros produtivos e reprodutivos numa exploração de bovinos de leite na região Norte de Portugal Continental. Foram analisadas 100 amostras de soro através de testes de ensaio por imunoabsorção enzimática (ELISA) para *N. caninum*. A seroprevalência na exploração foi de 28% (28/100, 95% CI: 19,70 – 38,01). Verificou-se uma diferença significativa na variável 'produção' e 'tempo de gestação' entre os animais seropositivos e os animais seronegativos ($P\text{-value}=0,007$ e $P\text{-value}=0,01$), respetivamente. Já na variável 'abortos', verificou-se uma correlação de $P\text{-value}=0,07$ e (*Odd ratio*) $OR=3,77$ (95% CI). Também se pode concluir que existem diferenças no número de inseminações artificiais e de intervalo entre partos, concluindo-se que são necessárias 1,56 vezes mais inseminações artificiais (IA) para que ocorra gestação nos animais seropositivos. Já o intervalo entre partos (IEP) médio foi de 415 dias nos animais positivos e de 385 em animais negativos. Com isto, pode concluir-se que *N. caninum* afeta negativamente os parâmetros produtivos e reprodutivos das explorações de bovinos de leite.

Palavras-chaves: *Neospora caninum*; seroprevalência; bovinos; parâmetros produtivos e reprodutivos; Portugal.

Abstract

Neospora caninum is an obligatory intracellular protozoan parasite that causes reproductive and productive losses, being responsible for significant economic losses in cattle. This study was conducted to investigate the seroprevalence of *N. caninum* and its influence on productive and reproductive parameters in a dairy cattle farm in the northern region of mainland Portugal. One hundred serum samples were analyzed using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) tests for *N. caninum*. The seroprevalence in the farm was 28% (28/100, 95% CI: 19.70 – 38.01). A significant difference was observed in 'production' and 'gestation length' variables between seropositive and seronegative animals ($P\text{-value}=0.007$ and $P\text{-value}=0.01$), respectively. Regarding the 'abortions' variable, a correlation of $P\text{-value}=0.07$ and *odd ratio* (OR) of 3.77 (95% CI) were found. It can also be concluded that there are differences in the number of artificial inseminations (IA) and the calving interval, with seropositive animals requiring 1.56 times more IA for successful pregnancy. The mean calving interval (IEP) was 415 days in positive animals and 385 days in negative animals. Therefore, it was concluded that the *N. caninum* parasites has a negative impact on the productive and reproductive parameters of dairy cattle farms.

Keywords: *Neospora caninum*; seroprevalence; dairy cattle; productive and reproductive parameters; Portugal.

1. Introdução

Neospora caninum é um parasita intracelular obrigatório que possui um ciclo de vida complexo, sendo capaz de infectar várias espécies animais (Cao et al., 2022). Este protozoário do Filo Apicomplexa (Dubey et al., 1988), é o principal responsável por abortos de origem infecciosa em bovinos (Gliga et al., 2022) e, por consequência, responsável pela elevada perda económica na produção de bovinos (Sokol-Borrelli et al., 2020).

N. caninum apresenta um ciclo de vida heteroxeno facultativo, no qual possui o cão (*Canis lupus familiaris*), o lobo (*Canis lupus*), o coiote (*Canis latrans*) e o dingo (*Canis lupus dingo*) como hospedeiros definitivos do ciclo, ou seja, onde ocorre a replicação sexual do parasita (Donahoe et al., 2015).

Os hospedeiros definitivos ficam infectados ao ingerir bradizoítos enquistados de *N. caninum* de placentas, tecidos musculares e tecidos nervosos provenientes de hospedeiros intermediários infectados, principalmente de bovinos. Depois de aproximadamente cinco dias, os canídeos libertam oocistos nas fezes durante duas a três semanas (Dubey et al., 2007). Os oocistos esporulados (com esporozoítos) podem permanecer no ambiente durante meses, principalmente em condições de temperaturas e humidade amenas, até que sejam ingeridos pelos hospedeiros intermediários (transmissão horizontal). Os bovinos são os hospedeiros intermediários naturais de *N. caninum* (Yang et al., 2022), contudo, diversos estudos descrevem a infeção em pequenos ruminantes (Hu et al., 2022), camelídeos (Moré et al., 2008), cervídeos (Donahoe et al., 2015), suínos (Gui et al., 2019), aves (Liu et al., 2019) e pequenos roedores (Dubey et al., 2007). Dependendo da fonte de infeção, a transmissão de *N. caninum* poderá ocorrer por via horizontal ou por via vertical. A transmissão vertical (também referida como transmissão transplacentária ou congénita) é a forma predominante de transmissão nos bovinos. Dentro da transmissão vertical, existem duas formas: endógena e exógena. Transmissão vertical exógena ocorre após a ingestão de oocistos esporulados (forma infetante) por bovinos *naïve* e está associada a surtos de abortos epidémicos no efetivo. Por outro lado, a transmissão vertical endógena ocorre quando uma vaca gestante persistentemente infetada, transmite o parasita por via transplacentária à sua cria; este modo de transmissão é responsável pela perpetuação do parasita na exploração (Donahoe et al., 2015; Dubey et al., 2007; Gliga et al., 2022).

Este protozoário é conhecido por causar patologias musculares e neuronais no hospedeiro definitivo (canídeos). Já nos bovinos infectados, a neosporose é responsável por abortos e nados mortos, causando perdas económicas significativas. Em certos casos, este parasita também poderá causar infertilidade, redução da *performance* produtiva e reprodutiva (Lindsay et al., 2020). A infeção com *N. caninum* pode causar patologia uterina e diminuição da taxa de conceção em vacas em lactação sendo por isso considerada a principal causa de falha reprodutiva em bovinicultura. Também lhe está diretamente associada uma diminuição da produção diária comparativamente a vacas não infetadas (Barros et al., 2021; Bartels et al., 2006).

Devido à sua distribuição mundial, a neosporose representa uma ameaça à indústria de produção de bovinos (Hu et al., 2022). Estudos (Reichel et al., 2013) demonstram que os prejuízos causados pela

infecção de *N. caninum* podem superar os 540 milhões de dólares na bovinicultura de leite norte americana.

A seroprevalência de *N. caninum* na Europa varia entre 16% e 76% em bovinos de leite (Gliga et al., 2022). O primeiro diagnóstico de neosporose em Portugal foi em 2001 (Canada et al., 2002), e, desde então, tem vindo a ser monitorizada (Fortunato et al., 2010). Um estudo recente demonstrou que a seroprevalência de *N. caninum* em animais testados em Portugal foi de 17,2%, enquanto a seroprevalência do conjunto das explorações estudadas foi de 68,6%. (Waap et al., 2022).

O objetivo da dissertação foi o de estudar a seroprevalência numa exploração de bovinos de leite - em Portugal - e compreender de que modo se pode relacionar a sua influência nos parâmetros produtivos e reprodutivos. De forma mais global, entendemos que o estudo deste tema seria fundamental para entender o impacto da neosporose nas explorações e interpretar o seu impacto negativo na sua rentabilidade.

2. Materiais e Métodos

2.1. Caracterização do local do estudo e colheita de amostras

Foram colhidas 100 amostras de sangue numa exploração de bovinos de leite localizada em Barcelos, em novembro de 2022. O concelho de Barcelos (41° 32' 05" N 8° 36' 54" O) localiza-se na região Norte de Portugal Continental. Apresenta um clima ameno, caracterizada por ter no verão uma temperatura média de 23°C, enquanto o inverno possui uma temperatura média de 16°C. Quanto à precipitação, é no mês de dezembro que se verifica uma maior pluviosidade (136mm), por outro lado, o mês de julho é o mais seco, com uma precipitação de 13mm, segundo a Weather Spark, (2023).

Trata-se de uma exploração familiar com ordenha robotizada e aproximadamente 60 animais em produção, inseridos num sistema de estabulação livre. O alimento é disponibilizado na manjedoura por um sistema *total mixed ration* (TMR), sendo constituído por silagem de milho, palha e alimento concentrado. Os silos encontram-se no exterior da exploração.

Os animais encontravam-se vacinados para a *Bovine viral diarrhea* (Diarreia Viral Bovina), para a *Infectious bovine rhinotracheitis* (Rinotraqueíte Infeciosa Bovina) e para *Clostridium* spp. O Controlo reprodutivo incluía a visita do médico veterinário assistente da exploração a cada duas semanas e a utilização da técnica de inseminação artificial (IA) no manejo reprodutivo.

As amostras foram recolhidas em novembro de 2022. Aproximadamente 5 mL de sangue foram colhidos através de punção venosa na veia coccígea em tubos sem anticoagulante. As amostras de soro (após coagulação do sangue) foram identificadas e armazenadas à temperatura de -20°C até serem analisadas. Todos os procedimentos foram executados por profissionais habilitados, pertencentes a um laboratório de referência naquela região.

2.2. Teste serológico

A presença de anticorpos anti-IgG de *N. caninum* foi detetada usando um *kit* comercial de ELISA indireto (Civtest®Bovis Neospora, Laboratórios Hipra, Espanha), seguindo as instruções do fabricante. Este *kit* tem uma elevada sensibilidade e especificidade, superior a 95% (Alvarez-García et al., 2013). A densidade ótica (OD) de cada amostra foi medida a 405nm através de um leitor de microplacas. Para o teste ser considerado válido, a OD controlo positivo teria de ser >0,9 e quando o rácio (OD controlo positivo/ OD controlo negativo) fosse >5,0. Segundo o fabricante, os animais com resultados S/P%≤10% foram considerados negativos, enquanto os resultados S/P%>11% foram considerados positivos.

2.3. Dados recolhidos – avaliação dos parâmetros produtivos e reprodutivos

Foram recolhidos do programa de assistência à exploração os dados produtivos e reprodutivos relativos a todas as vacas, novilhas e vitelas em que se realizou a pesquisa de *N. caninum*. Como critérios de inclusão, foram considerados, neste estudo, os animais que tenham parido pelo menos uma vez, com o objetivo de se poder avaliar os respetivos parâmetros reprodutivos, nomeadamente o número de lactações, número de inseminações artificiais, intervalo entre partos, tempo de gestação, número de abortos e idade gestacional do aborto. Já os dados sobre produção leiteira também se incluíram nesses critérios de inclusão. Dados sobre idade foram recolhidos de forma transversal a todo o efetivo da exploração.

2.4. Análise estatística

Foram usados os testes *Wilcoxon rank sum* e *Fisher's Exact* para analisar as variáveis (produção, tempo de gestação e abortos) associados à infeção de *N. caninum*.

Para verificar a relação entre a seropositividade e as variáveis produtivas e reprodutivas (produção, tempo gestação e abortos) da exploração em estudo, utilizando-se o Programa *R Core Team* (2022) (*R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria*. URL <https://www.R-project.org/>). A variável *P-value*<0,05 foi considerada estatisticamente significativa. Os resultados serão apresentados como *odds ratios* (OR) com intervalo de confiança de 95% (95% CI).

3. Resultados

3.1. Seroprevalência de *Neospora caninum* na exploração

Foi possível observar que a seroprevalência de *N. caninum* na exploração foi de 28% (CI: 19,70 – 38,01).

Ao analisar a Tabela 1, nos animais positivos (28), verificou-se uma maior seropositividade nos animais com idade compreendida entre os dois e três anos de idade (71%, 20/28), comparativamente aos animais até ao primeiro ano (11%, 3/28) e animais com mais de três anos (18%, 5/28) (Tabela 1).

Tabela 1: Animais seropositivos a *Neospora caninum* na exploração.

Fator	Categoria	Animais positivos	Nº positivos	Prevalência (%)
Idade	0<ano≤1	28	3	11
	2≤anos≤3	28	20	71
	> 3 anos	28	5	18

3.2. Resultados da estatística descritiva dos parâmetros produtivos e reprodutivos

O número de lactações, o intervalo entre partos e o número de inseminações por parto foram alguns dos parâmetros produtivos e reprodutivos abordados neste estudo. O número médio de lactações na exploração foi 1,87; já nos animais serologicamente positivos, o número médio de lactações foi 1,25, enquanto o número médio de lactações nos animais serologicamente negativos foi 2,11 (Tabela 2).

No que diz respeito ao intervalo entre partos médio da exploração, verificámos 391 dias. Nos animais positivos a *N. caninum*, o IEP foi de 415 dias, ao passo que nos animais positivos foi de 386 dias, tal como se pode ver na Tabela 2.

Por fim, o número médio de IA por parto na exploração em estudo foi 1,35. Os animais seropositivos apresentaram um maior número de IA por parto, cerca de 2 IA, enquanto os animais seronegativos tiveram uma média de 1,28 IA por parto (Tabela 2).

Tabela 2: Parâmetros produtivos e reprodutivos médios da exploração.

Parâmetros produtivos e reprodutivos	Ig-G anti – <i>N. caninum</i>		Exploração
	Positivos	Negativos	
	n=28	n=72	
Nº lactações	1,25	2,11	1,87±1,7
Intervalo entre partos	415	385,6	390,5±39,1
Nº Ia/parto	2	1,28	1,35±0,66

3.3. Resultados dos parâmetros avaliados estatisticamente

A análise estatística dos dados mostrou uma diferença significativa na variável 'produção' entre os animais seropositivos e os animais seronegativos ($W=736$; $P\text{-value}=0,007$). Isto demonstra que se verificou uma diferença estatisticamente significativa na produção entre os grupos estudados. Importa referir que o valor de W não é diretamente comparável entre estudos. Neste caso, o valor de $W=736$ sugere uma diferença substancial da produção entre o grupo de animais seropositivos e o grupo de animais seronegativos. O valor W é uma grandeza que permite medir do ponto de vista estatístico se uma amostra aleatória provém de uma distribuição normal (Bland, 2015). Estes resultados poderão ter implicações importantes para a compreensão dos fatores que afetam a produção no contexto estudado. Os resultados da análise estatísticas mostraram que a variável 'tempo de gestação' estava relacionada com a seropositividade e seronegatividade ($P<0,05$). Os animais seropositivos tiveram 269 dias de tempo de gestação quando comparados com os animais seronegativos que tiveram 278 dias. O valor de W nesta variável foi 718 mostrando que existe diferença entre as duas amostras avaliadas (Tabela 3).

Os resultados expressos na Tabela 3 mostraram que a variável 'abortos' não apresentara uma associação estatisticamente significativa com a seroprevalência estudada ($P\text{-value}=0,09$; $OR=3,77$; $IC:95\%$). Isto significa que não se poderá rejeitar a hipótese nula de que não há diferença significativa na prevalência de abortos entre os grupos estudados. No entanto, é importante notar que o valor OR de 3,77 sugere uma possível associação entre a presença da condição estudada e um aumento no risco de abortos. A idade média gestacional em que ocorrem os abortos foram 7,6 meses, sendo que a idade menor foram 6,5 meses e a idade maior foram 8,5 meses.

Tabela 3: Parâmetros produtivos e reprodutivos avaliados estatisticamente.

Parâmetros avaliados estatisticamente	Ig-G anti – <i>N. caninum</i>		P-value	Exploração	OR	Valor W
	Positivos n=28	Negativos n=72				
Produção / lactação (litros)	5930	8554	0,007	7732±3233,8	-	736
Tempo gestação (dias)	269	278	0,01	276±15,7	-	718
Abortos	0,143	0,042	0,09	0,07±0,2	3,77	-

4. Discussão

Neste estudo, avaliou-se a seroprevalência de *N. caninum* em bovinos de leite numa exploração de bovinos de leite localizada em Barcelos, na região Norte de Portugal Continental. Verificou-se que a seroprevalência neste estudo foi de 28%, contudo, esta pode variar consoante o país ou região em

estudo; por exemplo, a seroprevalência de *N. caninum* em efetivos da Sérvia e do Irão foram 7,20% e 23%, respetivamente. Já no Brasil, a seroprevalência de *N. caninum* verificada em várias regiões foi de 9,1% a 97,2% (Cao et al., 2022). Comparando com estudos feitos em Portugal (Waap et al., 2022; Barbosa et al., 2018), cuja seroprevalência foi 17,2% e 16,3%, respetivamente, conferiu-se que a percentagem de animais positivos nesta exploração em estudo foi superior (28%). Diferenças na seroprevalência podem estar relacionadas com as características específicas de determinada região, com as condições climáticas, sistemas de produção, presença de hospedeiros definitivos, manejo sanitário do efetivo ou o método de diagnóstico usado (Cao et al., 2022; Dubey et al., 2007).

Tendo em conta o ciclo de vida e as características do parasita *N. caninum*, existem condições que podem influenciar a viabilidade dos oocistos no ambiente, como o clima, a localização geográfica, as condições de manejo, o tamanho do efetivo, a idades dos animais, a densidade humana, como referiu Waap et al. (2022) num estudo realizado em Portugal. A presença ou a proximidade de cães em explorações de bovinos de leite constitui um importante fator de risco na seroprevalência, aumentando em 90% a probabilidade da presença de *N. caninum* no efetivo pecuário (Nicolino et al., 2017).

A infeção por *Neospora caninum* foi descrita há aproximadamente 30 anos, no final da década de 80 (Bjerkås et al., 1984). Em Portugal a neosporose foi diagnosticada pela primeira vez em 2001 (Fortunato et al., 2010).

González-Warleta et al. (2011), conclui na sua publicação que não existe relação estatisticamente significativa entre a seroprevalência de *N. caninum* e o intervalo entre partos até à concepção. Contudo não se observou o mesmo neste estudo, sendo que se notou um intervalo entre partos médio de 415 dias nos animais seropositivos e de 386 dias nos animais seronegativos. Fortunato et al. (2010), também verificaram uma perda da performance reprodutiva no seu estudo publicado em 2010. Os autores concluíram que, numa exploração localizada no Ribatejo, o intervalo entre partos entre animais seropositivos e seronegativos foi superior a 77 dias.

Os resultados deste estudo demonstram que a infeção com *N. caninum* pode afetar a produção em bovinos de leite. Tendo em conta os 305 dias de lactação os animais seropositivos produziram, em média, menos 93 litros comparativamente aos animais seronegativos. Neste estudo, verificou-se que a diferença foi efetivamente superior em relação a outros estudos. Esta discrepância poderá dever-se ao facto de os animais seropositivos se encontrarem, na sua maioria, na primeira lactação, ou seja, o seu valor produtivo aos 305 dias ser estipulado pelo programa de gestão da exploração. Neste sentido, bastará que ocorra uma alteração na fase de arranque da lactação para que o mesmo programa associe essa baixa produção nessa mesma fase a uma baixa produção aos 305 dias de lactação. Ainda assim, vários autores confirmam a correlação entre seropositividade e a diminuição da produção, como demonstrou Hernandez et al., (2001), um animal positivo a neosporose produz, em média, menos um litro de leite comparado a um animal seronegativo. No Canadá, um estudo demonstrou que em efetivos bovinos onde existam abortos associados a *N. caninum*, ocorrerá uma perda de produção de 276 litros em animais seropositivos comparados aos animais seronegativos, durante os 305 dias de lactação.

(Hobson et al., 2002). Pelo contrário, num estudo envolvendo 90 explorações de bovinos com seropositividades de 0% a 73%, não existiram diferenças significativas na produção entre os animais (VanLeeuwen et al., 2002).

López-Gatius et al. (2005), afirmou que um efetivo infetado com *N. caninum* não afeta a fertilidade de vacas altas produtoras. Neste mesmo estudo realizado em Espanha, os autores concluíram que não foram observadas diferenças entre o número de IA em animais seropositivos e seronegativos. Todavia, num estudo realizado na Grécia, Lefkaditis et al. (2020), verificou que foram necessárias 2,39 inseminações artificiais até haver concepção em animais negativos; pelo contrário, em animais positivos, foram necessárias 3,92 IA até ocorrer concepção (1,64 vezes mais), pelo que, vai ao encontro com o nosso estudo. Constatou-se que animais positivos precisam de 1,56 vezes mais IA para ficarem gestantes.

Nos últimos anos verificou-se uma melhoria ao nível do manejo, alimentação e seleção genética nas explorações de bovinos de leite. Nesse sentido, a produção de leite aumentou, contudo, associado a esse aumento de produtividade, a eficiência reprodutiva diminuiu consideravelmente (López-Gatius et al., 2005). Vacas seropositivas são mais propensas a abortar do que vacas seronegativas, sendo que o risco de aborto é superior quando o título individual de anticorpos específicos de *N. caninum* está aumentado (Dubey et al., 2007).

É importante considerar algumas limitações no estudo. As amostras usadas foram restritas apenas a uma avaliação, ou seja, todas as amostras correspondem apenas a uma colheita num determinado momento. Nesse sentido, acredita-se que o resultado obtido no parâmetro 'aborto' seja consequência dessa limitação. Além disso, o estudo concentrou-se exclusivamente na análise de amostras serológicas, não tendo havido pesquisa direta do agente nos abortos (ocorreram fora do período de estágio).

Vários estudos (Bartels et al., 2006; González-Warleta et al., 2011) demonstraram que existe sete a nove vezes maior probabilidade, respetivamente, de ocorrência de aborto em fêmeas seropositivas comparando a fêmeas seronegativas. Claro está que vacas seropositivas têm maior probabilidade de abortar, mas também é claro que existem animais seropositivos que não abortam (Haddad et al., 2005.) Estes autores, num estudo realizado no Canadá, defenderam a hipótese de que os fatores que aumentam a probabilidade de animais seropositivos a *N. caninum* abortarem ainda são desconhecidos, bem como os fatores que aumentam a probabilidade de qualquer vaca seropositiva abortar na gestação seguinte. Acredita-se que a elevada capacidade produtiva dos bovinos de leite esteja associada a imunossupressões durante a gestação e, conseqüentemente, a um aumento do risco de aborto em bovinos de leite. Também Dubey et al. (2007), afirmou que nem todos os efetivos com elevada seroprevalência sofrem abortos associados a *N. caninum*, suportando a hipótese de que, para além da infeção de *N. caninum*, outros fatores poderem influenciar o risco de aborto.

Jensen et al. (1999) detetou anticorpos anti *N. caninum* em 12% dos soros provenientes de animais sem histórico de perda reprodutiva.

Nos casos de inexistência de feto abortado para pesquisa direta do agente por *Polymerase chain reaction* (PCR), o diagnóstico de *N. caninum* como causa de aborto é baseado através da presença de anticorpos nos testes serológicos. No entanto, este tipo de abordagem é considerado limitado uma vez que os surtos de abortos nem sempre se verificam estritamente em animais seropositivos (Jenkins et al., 2002).

A neosporose é a principal causa de perdas reprodutivas em bovinicultura (Haddad et al., 2005). A importância económica da neosporose é traduzida, acima de tudo, pelas perdas embrionárias, perda de valor genético, perdas associadas às biotecnologias reprodutivas (perdas de IA), redução da produção leiteira e pelo aumento da taxa de refugo (Reichel et al., 2020).

A prevenção e o controlo de *N. caninum* são metodologias importantes de adotar nas explorações de espécies pecuárias. O processo de vacinação foi considerado a forma mais relevante de prevenção, contudo, não existem vacinas disponíveis para a prevenção da neosporose. Desta forma, o impacto negativo desta patologia apenas poderá ser minimizado através de medidas de biossegurança e de manejo entre os animais seropositivos e os animais seronegativos (Cao et al., 2022).

5. Conclusão

O presente estudo investigou a seroprevalência de *N. caninum* numa exploração de bovinos de leite, em Portugal Continental, usando o método indireto de ELISA. A seroprevalência geral deste parasita na exploração foi de 28%. Verificou-se uma relação significativa associada à infeção de *N. caninum* nos parâmetros produtivos e reprodutivos, nomeadamente na 'produção' e no 'tempo de gestação'. Nesse sentido, a elaboração de medidas de prevenção e controlo nas explorações verifica-se importante para a redução da seroprevalência.

6. Referências bibliográficas

- Álvarez-García, G., García-Culebras, A., Gutiérrez-Expósito, D., Navarro-Lozano, V., Pastor-Fernández, I., & Ortega-Mora, L. M. (2013). Serological diagnosis of bovine neosporosis: A comparative study of commercially available ELISA tests. *Veterinary Parasitology*, 198(1–2), 85–95. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.07.033>
- Barbosa, A., Pereira, A., & Afonso, C. (2018). A seroprevalência de *Neospora caninum* em Explorações Pecuárias Portuguesas. *Revista Agros*, 37, 18–19. https://www.agros.pt/wp-content/uploads/2018/12/Revista-Agros_N37.pdf
- Bartels, C., Van Schaik, G., Veldhuisen, J. P., Van Den Borne, B., Wouda, W., & Dijkstra, T. (2006). Effect of *Neospora caninum*-serostatus on culling, reproductive performance and milk production in Dutch dairy herds with and without a history of *Neospora caninum*-associated abortion epidemics. *Preventive Veterinary Medicine*, 77(3–4), 186–198. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2006.07.003>
- Bjerkås, I., Mohn, S. F., & Presthus, J. (1984). Unidentified cyst-forming Sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Zeitschrift Für Parasitenkunde*, 70(2), 271–274. <https://doi.org/10.1007/bf00942230>
- Bland, M. (2015). *An introduction to medical statistics*. Oxford University Press (United Kingdom). ISBN: 0199589925
- Canada, N., Meireles, C., Rocha, A., Sousa, S., Thompson, G., Dubey, J. P., Romand, S., Thulliez, P., & Da Costa, J. B. G. (2002). First Portuguese isolate of *Neospora caninum* from an aborted fetus from a dairy herd with endemic neosporosis. *Veterinary Parasitology*, 110(1–2), 11–15. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(02\)00333-3](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(02)00333-3)
- Cao, H., Zheng, W. B., Wang, Y., Gao, W. W., Liu, Q., Zhu, X. Q., Lei, Y. P., Tumen, B., & Song, H. Y. (2022a). Seroprevalence of *Neospora caninum* infection and associated risk factors in cattle in Shanxi Province, north China. *Frontiers in Veterinary Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.1053270>
- De Barros, L. D., Bogado, A. L. G., Furlan, D., De Melo Jardim, A., Okano, W., Da Silva, L. a. F., Pereira, C., Bronkhorst, D. E., Cardim, S. T., & Garcia, J. L. (2021). Effects of *Neospora caninum* on reproductive parameters in dairy cows from a closed herd in Brazil. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 23, 100524. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2020.100524>

- Donahoe, S. L., Lindsay, S. W., Krockenberger, M. B., Phalen, D. N., & Šlapeta, J. (2015). A review of neosporosis and pathologic findings of *Neospora caninum* infection in wildlife. *International Journal for Parasitology. Parasites and Wildlife*, 4(2), 216–238. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2015.04.002>
- Dubey, J. P., Carpenter, J. L., Speer, C. A., Topper, M., & Uggla, A. (1988). Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *PubMed*, 192(9), 1269–1285. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3391851>
- Dubey, J. P., Schares, G., & Ortega-Mora, L. M. (2007). Epidemiology and Control of Neosporosis and *Neospora caninum*. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(2), 323–367. <https://doi.org/10.1128/cmr.00031-06>
- Fortunato, M., Guerreiro, D. D. S., & Stilwell, G. (2010). *Neospora caninum* como causa de aborto bovino em explorações leiteiras. *Vaca Leiteira*, XVIII, 1–7. https://www.aaip.pt/artigo_neospora.pdf
- Gliga, D. S., Basso, W., Ardüser, F., Moore-Jones, G., Schares, G., Zanolari, P., & Frey, C. F. (2022). Switzerland-wide *Neospora caninum* seroprevalence in female cattle and identification of risk factors for infection. *Frontiers in Veterinary Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.1059697>
- González-Warleta, M., Castro-Hermida, J. A., Carro-Corral, C., & Mezo, M. (2011). Anti-*Neospora caninum* antibodies in milk in relation to production losses in dairy cattle. *Preventive Veterinary Medicine*, 101(1–2), 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2011.04.019>
- Gui, B., Lv, Q., Ge, M., Li, R., Zhu, X., & Liu, G. (2020). First report of *Neospora caninum* infection in pigs in China. *Transboundary and Emerging Diseases*, 67(1), 29–32. <https://doi.org/10.1111/tbed.13358>
- Haddad, J. P., Dohoo, I. R., & VanLeewen, J. A. (2005). A review of *Neospora caninum* in dairy and beef cattle—a Canadian perspective. *Canadian Veterinary Journal—revue Veterinaire Canadienne*, 46(3), 230–243.
- Hernandez, J. A., Risco, C. A., & Donovan, A. J. (2001). Association between exposure to *Neospora caninum* and milk production in dairy cows. *Javma—journal of the American Veterinary Medical Association*, 219(5), 632–635. <https://doi.org/10.2460/javma.2001.219.632>
- Hobson, J., Duffield, T. F., Kelton, D. F., Lissemore, K. D., Hietala, S. K., Leslie, K. E., McEwen, B., Cramer, G., & Peregrine, A. S. (2002). *Neospora caninum* serostatus and milk production of

Holstein cattle. *Javma-journal of the American Veterinary Medical Association*, 221(8), 1160–1164. <https://doi.org/10.2460/javma.2002.221.1160>

Hu, X., Xie, S., Liang, Q., Sun, L., Li, Z., Yang, J., Zhu, X., Zou, F., & He, J. (2022). Seroprevalence and risk factors of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infection in black goats in Yunnan Province, Southwestern China. *Frontiers in Veterinary Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.975238>

Jenkins, M. A., Baszler, T. V., Björkman, C., Schares, G., & Williams, D. L. (2002). Diagnosis and seroepidemiology of *Neospora caninum*-associated bovine abortion. *International Journal for Parasitology*, 32(5), 631–636. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(01\)00363-0](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(01)00363-0)

Jensen, A. F., Björkman, C., Kjeldsen, A., Wedderkopp, A., Willadsen, C., Ugglå, A., & Lind, P. (1999). Associations of *Neospora caninum* seropositivity with gestation number and pregnancy outcome in Danish dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 40(3–4), 151–163. [https://doi.org/10.1016/s0167-5877\(99\)00048-3](https://doi.org/10.1016/s0167-5877(99)00048-3)

Lefkaditis, M., Mpairamoglou, R., Sossidou, A., Spanoudis, K., & Tsakiroglou, M. (2020). *Neospora caninum*, A potential cause of reproductive failure in dairy cows from Northern Greece. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 19, 100365. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2019.100365>

Liu, M., Lv, Q., Jiang, W., Li, J., Gui, B., Zheng, W., Zhu, X., & Liu, G. (2019). Molecular detection of *Neospora caninum* from naturally infected four passeriforme birds in China. *Acta Tropica*. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105044>

Lindsay, D. S., & Dubey, J. P. (2020). Neosporosis, Toxoplasmosis, and Sarcocystosis in Ruminants. *Veterinary Clinics of North America-Food Animal Practice*, 36(1), 205–222. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2019.11.004>

López-Gatius, F., Santolaria, P., & Almería, S. (2005). *Neospora caninum* Infection Does Not Affect the Fertility of Dairy Cows in Herds with High Incidence of *Neospora*-associated Abortions. *Journal of Veterinary Medicine Series B-Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, 52(1), 51–53. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.2004.00811.x>

McAllister, M. M. (2016). Diagnosis and Control of Bovine Neosporosis. *Veterinary Clinics of North America-Food Animal Practice*, 32(2), 443–463. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2016.01.012>

Melendez, P., Ilha, M. R. S., Woldemeskel, M., Graham, J., Coarsey, M., Baughman, D., Whittington, L., & Naikare, H. (2021). An outbreak of *Neospora caninum* abortion in a dairy herd from the State of Georgia, United States. *Veterinary Medicine and Science*, 7(1), 141–147. <https://doi.org/10.1002/vms3.346>

Moré, G., Pardini, L. C., Basso, W., Marín, R., Bacigalupe, D., Auad, G., Venturini, L., & Venturini, M. (2008). Seroprevalence of *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii* and *Sarcocystis* sp. in llamas (*Lama glama*) from Jujuy, Argentina. *Veterinary Parasitology*, 155(1–2), 158–160. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.04.003>

Nicolino, R. R., De Oliveira, C. I., Lopes, L. B., Rodrigues, R., & Haddad, J. P. A. (2017). Prevalence and risk factors associated with anti-*Neospora caninum* antibodies in dairy herds in the central region of Minas Gerais State, Brazil. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 10, 71–74. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2017.08.008>

Reichel, M. P., Ayanegui-Alcérreca, M. A., Gondim, L. F. P., & Ellis, J. (2013). What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle – The billion-dollar question. *International Journal for Parasitology*, 43(2), 133–142. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.10.022>

Reichel, M. P., Wahl, L. C., & Ellis, J. (2020). Research into *Neospora caninum*—What Have We Learnt in the Last Thirty Years? *Pathogens*, 9(6), 505. <https://doi.org/10.3390/pathogens9060505>

Sokol-Borrelli, S. L., Coombs, R. S., & Boyle, J. P. (2020). A Comparison of Stage Conversion in the Coccidian Apicomplexans *Toxoplasma gondii*, *Hammondia hammondi*, and *Neospora caninum*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.608283>

VanLeeuwen, J. A., Keefe, G. P., & Tiwari, A. N. (2002). Seroprevalence and productivity effects of infection with bovine leukemia virus, *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis, and *Neospora caninum* in Maritime Canadian dairy cattle. *The Bovine Practitioner*, 86–91. <https://doi.org/10.21423/bovine-vol36no2p86-91>

Waap, H., Bärwald, A., Nunes, T., & Schares, G. (2022). Seroprevalence and Risk Factors for *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in Cattle in Portugal. *Animals*. <https://doi.org/10.3390/>