

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA
FACULTAT DE VETERINÀRIA
DEPARTAMENT DE SANITAT I ANATOMIA ANIMALS

Estudi de la neosporosi a la cabana bovina d'aptitud càrnia del Principat d'Andorra

Ramon N. Armengol i Gelonch

Direcció: Dra. Sònia Almería de la Merced

TESI DOCTORAL 2008

La Dra. SONIA ALMERÍA de la MERCED, Professora Titular d'Universitat de l'Àrea de Coneixement de Sanitat Animal del Departament de Sanitat i Anatomia Animals, Facultat de Veterinària (Universitat Autònoma de Barcelona)

CERTIFICA:

Que el senyor Ramon N. Armengol i Gelonch ha realitzat la tesis doctoral que té per títol “Estudi de la neosporosi a la cabana bovina d’aptitud càrnia del Principat d’Andorra” sota la meva direcció.

I per a què així consti als efectes oportuns, signo aquest certificat

Bellaterra,

Dra. Sonia Almería de la Merced

AGRAÏMENTS

Voldria agrair a totes aquelles persones que m'han ajudat a dur a terme aquest treball durant tota la seva elaboració, des del primer moment en què vaig decidir introduir-me a la recerca i compaginar-la amb la meva feina diària de clínica i assessoria veterinària d'explotacions de boví.

A la Dra. Sonia Almeria per admetre dirigir la meva tesi doctoral, per ser tan treballadora, optimista, carinyosa i sempre disposada a donar un cop de mà.

Al Dr. Joaquim Castellà per la seva tutoria i ajut prestat durant aquests anys.

Al Dr. Gutiérrez sempre interessat a col.laborar i artífex d'aquest estudi.

Al Dr. López Gàtius per haver col.laborat amb els seus coneixements i la seva crítica sempre constructiva.

A la Dra. Pilar Santolaria pel seu ajut en els anàlisis estadístics.

Als companys de departament.

A la Consòl Naudí, Dr. Alay, Jesus Muro, Toni Bernadó i Tresa Plana, que junt amb la resta de persones que conformen el Departament d'Agricultura del M.I. Govern d'Andorra m'han recolzat i animat sempre que ho he necessitat.

Als ramaders andorrans per haver posat tant d'interès en aquest estudi.

Als meus companys veterinaris Daniel Ponté i José Mallo per la seva comprensió, paciència i empenta.

Als meus amics Oriol, Santi, Carles, Sergio, Ricard, Pau, Jordi, Marta, Adriana, Maile pel vostre interès i les vostres crítiques sempre encertades.

Agrair el suport incondicional de la meva família, sobretot als meus pares, avis i germans.

I sobretot, moltes gràcies Marta.

A tots moltes gràcies.

ABREVIACIONS

Ac	Anticòs
AU	Raça Aubrach
BoHV1	Herpesvirus boví tipus 1
BoHV2	Herpesvirus boví tipus 2
BR	Raça Bruna d'Andorra
DF	Raça Deutsche Fleckvieh
F	Raça Frisona
G	Raça Gascona
IBR	Rinotraqueïtis infecciosa bovina
IFI	Immunofluorescència indirecta
IHC	Immunohistoquímica
IPV	Vulvovaginitis pustular infecciosa
HD	Hoste definitiu
HI	Hoste intermediari
L	Raça Llemosina
M	Raça Montbeliarde
P	Provabilitat
p	Prevalença
PCR	Reacció en cadena de la polimerassa
SNC	Sistema nerviós central
XBR	Creuament de raça bruna d'Andorra
XDF	Creuament de la raça deutsche fleckvieh
XF	Creuament de la raça frisona
XG	Creuament de la raça gascona
XL	Creuament de la raça llemosina
XM	Creuament de la raça montbeliarde
X	Raça Charolais
XX	Creuament de la raça charolais

ÍNDIX.

- Agraïments.....	I
- Abreviacions.....	II
- Índex.....	III
- Resum	1
- Revisió bibliogràfica	3
• <i>Neospora caninum</i>	4
▪ ...El paràsit.....	4
▪ ...Cicle del paràsit i formes de transmissió.....	4
▪ ...Epidemiologia.....	8
▪ ...Cicle selvàtic.....	11
▪ ...Patogènia i lesions.....	12
▪ ...Immunitat.....	16
▪ ...Quadre clínic de <i>N. caninum</i> en gossos.....	18
▪ ...Quadre clínic de <i>N. caninum</i> en bovins.....	19
▪ ...Diagnòstic en casos d'avortament.....	20
▪ ...Diagnòstic diferencial.....	22
▪ Control epidemiològic i reproductiu de la infecció.....	22
- Hipòtesi de treball	25
- Material i mètode	27
• Localització de l'estudi: Principat d'Andorra.....	28
• Dades de la població la població i el seu estatus productiu.....	30
▪ Animals sotmesos a estudi.....	30
▪ Sistema productiu del Principat d'Andorra.....	30
• Mostreig i processament de dades.....	33
▪ Mostres serològiques.....	33
❖ Animals.....	33
❖ Tècnica ELISA indirecta.....	34
▪ Mostres histològiques.....	35
❖ Animals.....	35
❖ Tècnica de PCR.....	36
❖ Anàlisi histopatològic i immunohistoquímica.....	37
▪ Anàlisi estadístic.....	38

	pàg.
- Resultats	39
• Dades serològiques a nivell del Principat.....	40
▪ Factors que afecten la seroprevalença de <i>N. caninum</i> a Andorra.....	41
❖ Edat.....	41
❖ Parròquia.....	43
❖ Raça.....	43
▪ Factors que no afecten la seroprevalença de <i>N. caninum</i> a Andorra.....	45
❖ Any de mostreig.....	45
❖ Sexe.....	45
❖ País d'origen.....	46
❖ Propietari-explotació.....	47
❖ Efecte “repetició de mostreig”.....	48
▪ Dades serològiques en gossos.....	49
▪ Estudi dels fetus avortats i relació de desordres reproductius de les vaques avortades.....	49
• Dades serològiques a nivell de parròquies.....	53
▪ Canillo.....	53
▪ Encamp.....	55
▪ Ordino.....	57
▪ La Massana.....	58
▪ St. Julià de Lòria.....	59
- Discussió general	60
- Plans d'actuació	72
• Pla d'actuació diagnòstica del paràsit.....	73
• Pla de control del paràsit a les explotacions.....	73
• Mesures de control de pràctica general.....	74
• Mesures concretes derivades d'aquest estudi per erradicar <i>N.caninum</i> en els bovins d'Andorra.....	74
- Conclusions de l'estudi	76
- Bibliografia	78

RESUM.

Resum

Aquesta tesi ha estudiat la seroprevalença de *Neospora caninum* i els factors de risc que la afecten en bovins d'aptitud càrnia a Andorra. S'ha avaluat els nivells d'anticossos de *N. caninum* mitjançant la tècnica d'ELISA considerant mostres de 1758 animals majors de 6 mesos d'edat, pertanyents a 26 explotacions. Gairebé el 85% de les 26 explotacions estudiades han estat exposades a *N. caninum* amb seroprevalença mitjana d'anticossos a les explotacions 7.4%. L'edat, les diferents pastures comunals i la raça, van ser els factors de risc que afecten la seroprevalença de la infecció al Principat. Els resultats suggereixen que la localització de les zones de pastura podrien potenciar la transmissió horitzontal d'aquest paràsit i que algunes races són més resistents a la infecció per *N. caninum* que d'altres.

Summary

The present PhD presents the results of a serological survey performed to analyze *Neospora caninum* seroprevalence and risk factors affecting seroprevalence in beef cattle in Andorra were investigated. Antibodies to *N. Caninum* were evaluated by ELISA performed on a yearly basis in 1,758 animals older than 6 mo, belonging to 26 herds. Almost 85% of the analyzed herds had at least one positive animal. Mean herd seroprevalence of antibodies to *N. Caninum* was 7.4%. Age, summer grazing area of the herds and breed emerged as the main risk factors affecting seroprevalence of *N. Caninum* infection in Andorra. The results suggest that the particular grazing location could promote the horizontal transmission of this parasite and certain breeds are less susceptible to *N. Caninum* infection than others.

REVISIÓ BIBLIOGRÀFICA.

NEOSPORA CANINUM:

El paràsit

Neospora caninum és un paràsit protozoari apicomplexa de la família *Sarcocystidae* (Dubey et al., 1988) que presenta una gran semblança morfològica i clínica amb *Toxoplasma gondii*. El paràsit es va detectar per primer cop en gossos que presentaven coixeses el 1984 (Bjerkas et al., 1984) i durant els primers anys només se'l va relacionar amb una malaltia dels gossos. Durant els anys 90 es va començar a relacionar amb avortaments bovins (Thilsted and Dubey, 1989; Anderson et al., 1991; Barr et al., 1991). A l'actualitat *N. caninum* està present en tot el món i se'l reconeix com una de les principals causes en els avortaments bovins.

Cicle del paràsit i formes de transmissió

L'hoste definitiu (HD), en el qual s'esdevé la fase de reproducció sexual del paràsit, fou desconegut durant anys. Se sospitava d'un carnívor, però no va ser fins el 1998, que els investigadors (McAllister i col.laboradors) van trobar ooquistes del paràsit a les femtes de gossos que havien estat alimentats amb ratolins infectats amb *N. caninum*.

Més recentment, també s'ha descobert en femtes de cànids silvestres, com els coiots i les guineus als Estats Units i Canadà respectivament (Gondim et al., 2004; Wapenaar et al., 2006).

Els ooquistes són subesfèrics, de 10-11 µm de diàmetre, i s'eliminen no esporulats. Els ooquistes esporulen a l'exterior al cap d'uns 3 dies, contenint 2 esporocistes, cadascun dels quals té 4 esporozoïts (McAllister et al., 1998; Lindsay et al., 1999). Els ooquistes que van alliberar els gossos van ser molt pocs, i pot succeir que els

gossos, tot hi alliberar-ne, no facin seroconversió positiva a *N. caninum* (McAllister et al., 1998).

S'ha observat recurrència en l'alliberació d'ooquistes (McGarry et al., 2003), però es desconeix amb quina freqüència. No es coneix el temps de supervivència dels ooquistes al medi ambient ni molts aspectes del cicle intern a l'hoste definitiu, així com si hi ha més hospedadors definitius (Dubey, 1999).

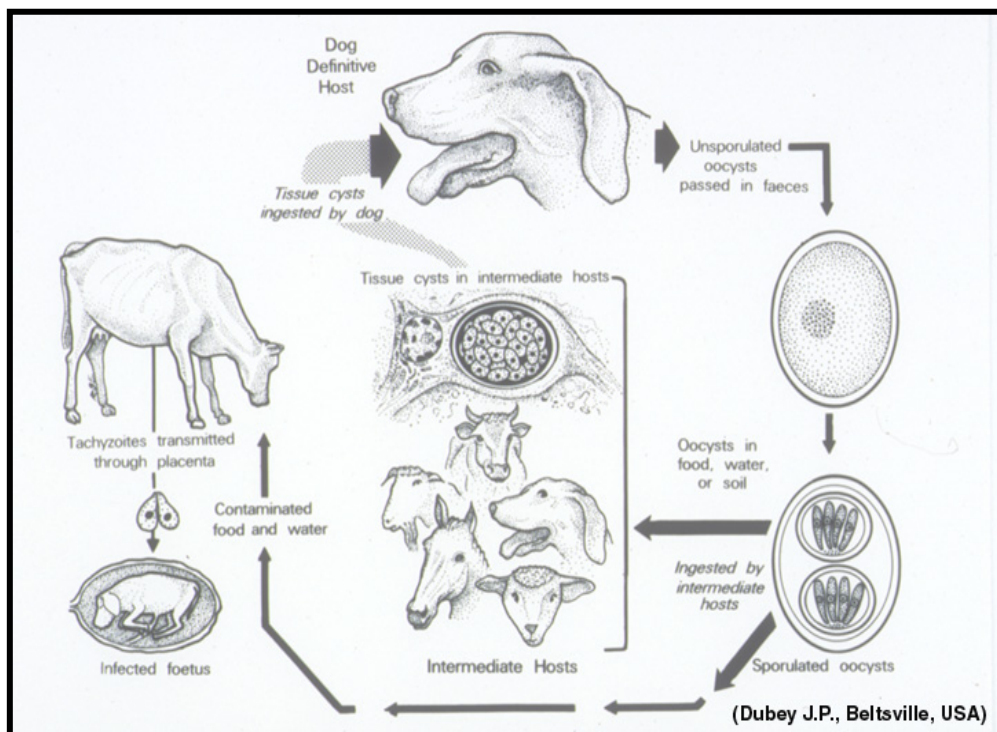


Fig.1 Cicle de *Neospora caninum* (Dubey, 1999).

Els HD, cànids domèstics i silvestres (McAllister et al., 1998, Gondim et al., 2004, Wapenaar et al., 2006) excreten ooquistes de *N. caninum* a través de la femta. Els bovins poden ingerir els ooquistes esporulats amb l'aliment o l'aigua de beguda, constituint la transmissió horitzontal del cicle.

El gos, pot ingerir quists del paràsit si consumeix teixits o restes placentàries crues d'un hoste intermediari (HI), tancant així el cicle del paràsit (Figura 1).

Experimentalment s'ha comprovat l'infecció de gossos després d'haver ingerit teixits de bovins (Dijkstra et al., 2001) i d'animals silvestres infectats de manera natural (Gondim et al., 2004). Els casos de detecció d'ooquistes en femtes de gossos per infecció natural són, no obstant, escassos (Basso et al., 2001).

Diverses espècies de mamífers poden actuar d'hostes intermediaris de *N. caninum*, incloent el gos, coiots i guineu vermella, per exemple: boví, oví, cabrum, cèrvids, cavalls i, probablement, per evidències serològiques, moltes més, entre altres els búfals d'aigua i camells.

Experimentalment, s'ha induït la infecció en moltes altres espècies animals, tot i això, a la natura, els hostes més comuns de *N. caninum* són el gos i els bovins (Dubey, 1999).

S'ha experimentat sobre la exposició humana al paràsit (Tranas et al., 1999) però fins un estudi recent (Lobato et al., 2006) que va detectar anticossos en persones, en cap dels estudis que s'han realitzat s'ha pogut demostrar si el paràsit pot ser causa de zoonosi (Petersen et al., 1999; Graham et al., 1999). S'ha descobert que primats no humans poden transmetre el paràsit a la seva descendència durant la gestació (Barr et al., 1994). L'estudi de Lobato et al., (2006) a Brasil, ha detectat la presència d'anticossos de *N. caninum* en pacients amb SIDA (38%) i en pacients amb problemes neurològics (18%). En neonats i persones sanes la seroprevalença d'anticossos va ser menor (5% i 6%, respectivament). La seropositivitat va ser confirmada amb immunoblotting.

Quan un HI consumeix aigua o aliment contaminats amb ooquistes esporulats de *N. caninum*, en forma de taquizoïts, penetra a les cel.lules de l'hoste per invasió

activa (Hemphill et al., 1996). Els taquizoïts tenen una mida de 3-7 x 1-5 μm i tenen una forma ovoide, de lluna o globular, la seva divisió és per endodiogènia (Figura 2). Es poden trobar en varietat de cel.lules, però amb freqüència es troben a les cel.lules nervioses (Bjerkas and Presthus, 1989; Speer and Dubey, 1989; Wouda et al., 1997). Els taquizoïts estan situats al vacúol parasitòfor, al citoplasma de la cel.lula hoste, i presenten un complex apical compost per dos anells apicals. També presenten un conoide, amb més de 150 micronemes i 8-18 roptries (estructures del complex apical, que podrien participar en la penetració del paràsit a la cel.lula), algunes de les quals s'estenen posteriors al nucli (Speer and Dubey, 1989; Lindsay et al., 1993). Els taquizoïts, de creixement ràpid, són eliminats gràcies a la resposta immune de l'hoste, que els porta cap a un estadi de desenvolupament lent de bradizoïts enquistats (Hemphill, 1999). Els bradizoïts són prims (6-8 X 1-1.8 μm) i contenen les mateixes organel·les que contenen els taquizoïts, però tenen menys roptries (Jardine, 1996). Els quists tissulars es troben, sobretot, al teixit nerviós però també a teixit muscular i retina. Poden ser rodons o ovalats i de mides 5-27 X 6-31 μm . Les parets del quist són suaus i sol mesurar més d'1 μm de gruix (Bjerkas and Presthus, 1988; Jardine, 1996), molt més gruixuts que els de *Toxoplasma* que sol mesurar menys de 1 μm de gruix (Figura 3).

L'aïllament de quists de *Neospora* a teixits de bovins adults és rar, exceptuant un cas d'aïllament en el cervell d'una vaca (Sawada et al., 2000) i l'aïllament de quists a múscul esquelètic (Peters et al., 2001).

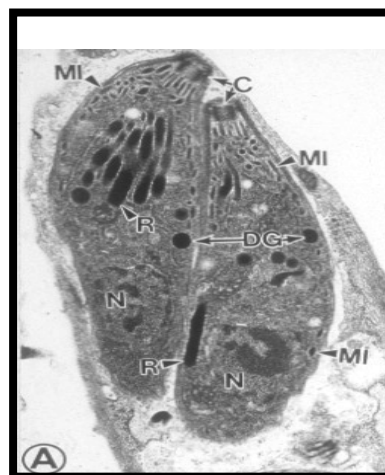


Figura 2. Endodiogènia de taquizoïts de *Neospora* (MI: micronemes; c: conoide; R: roptries; N:nucli; DG: Grànuls Densos). Foto cedida per J.P. Dubey.

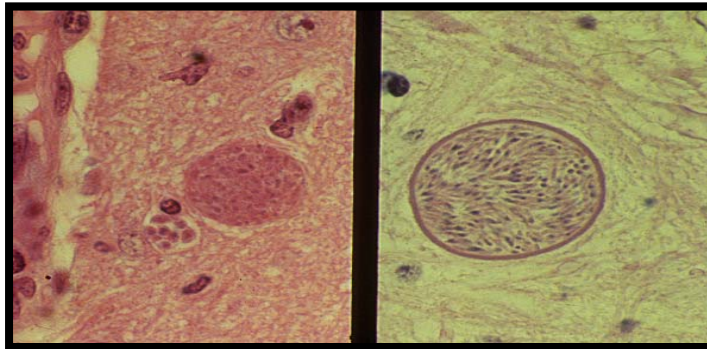


Figura 3. Comparació d'un quist de *Toxoplasma* (esquerra) i un quist de *Neospora* (dreta). Foto cedida per J.P Dubey.

Els estadis intestinals a l'hoste definitiu són requisit previ per a la reproducció sexual del paràsit i l'eliminació de ooquistes.

Els hostes intermediaris, a més de la ingestió d'ooquistes provinents del gos, s'infecten per transmissió vertical de mares a fills. Els taquizoïts poden passar de la mare al fetus via transplacentària, constituint la transmissió vertical. Aquesta es la forma principal de transmissió del paràsit en els ramats i durant temps, va ser la única via reconeguda de transmissió (Paré et al., 1996).

La transmissió lactogènica, tot i que es considera possible – experimentalment s'ha aconseguit infectar vedells recent nascuts- no sembla possible en condicions naturals i sembla no tenir importància epidemiològica (Davison et al., 1999; revisat Dubey, 2005)

La transmissió per via venèria es poc provable tot i que s'ha detectat DNA de *Neospora* en semen de braus (Caetano-da-Silva et al., 2004).

Epidemiologia

La neosporosi en boví ha estat registrada en regions i països de tot el món. En algunes regions, es considera que una gran proporció dels avortaments són causats per *N. caninum*. Hi ha diferències en les prevalences no només segons el país estudiat sinó també segons les regions on es localitzen les explotacions analitzades, fet que

provoca que els factors de risc i l'impacte econòmic de les infeccions per *Neospora* siguin diferents als ramats de diferents països i/o regions (Caetano-da-silva et al., 2004).

A Califòrnia o Holanda es considera el causant del 20-23% i 17% respectivament de tots els avortaments (Anderson et al., 1991, 1995; Wouda et al., 1997). En canvi, en d'altres països la prevalença és molt baixa. A Suècia, la prevalença de *N. caninum* en boví de llet és molt baixa i s'estima en un 2% i només s'han trobat anticossos de *N. caninum* en un 7% de les serologies realitzades en explotacions lleteres amb problemes d'avortaments (Björkman et al., 2000).

Per la seva proximitat geogràfica i especialment degut a l'intercanvi comercial des del punt de vista de la ramaderia, és interessant tenir en compte la situació de *N. caninum* a Espanya on s'han realitzat més treballs sobre aquesta parasitació. A Espanya, després de la descripció dels primers casos d'avortament en boví (Barberán et al., 1997; Fondevila et al., 1998), diferents estudis de seroprevalença en bestiar boví de diferents regions d'Espanya han posat de manifest l'amplia difusió de la infecció en el bestiar boví lleter espanyol (Quintanilla-Gozalo et al., 1999; Pereira-Bueno et al., 1999). A la regió Centre-Costa Asturiana, analitzant un percentatge d'animals en múltiples explotacions, un 30% dels animals estudiats varen ser seropositius i la presència del paràsit es considera endèmica d'aquesta zona (Mainar et al., 1999). Per altra banda, el que és més important és que entre el 32 i el 57 % dels fetus avortats procedents de diferents regions presenten infecció per *N. caninum* i entre el 33% y 58% dels ramats n'estan afectats (Gonzalez et al., 1999; Pereira-Bueno et al., 2003). Un estudi recent que ha comparat diversos països europeus, ha verificat que la seroprevalença real d'infecció en boví lleter a Espanya es més alta que la observada a Suècia, Holanda o Alemanya (Bartels et al., 2006). També la prevalença animal va ser més elevada (16,2%, interval de confiança 95%: 14,9%-17,5%) amb variacions elevades intra-ramat (Bartels et al., 2006). A Catalunya, en granges d'alta producció lletera s'ha observat una clara relació entre animals seropositius i avortaments causats per *N. caninum* independentment de la taxa de prevalença a les granges (López-Gatius et al., 2004a) Aquestes dades indiquen la importància de la infecció per *N. caninum* en l'espècie bovina lletera a Espanya.

La presència de múltiples i diversos factors sembla estar associada a la infecció per *Neospora* tals com la infecció pel virus BVD (Diarrea Viral Bovina) (Björkman et al., 2000). La infecció prèvia fa que els bovins siguin més resistents enfront a una reinfecció. Aquest fet és vàlid tant en ramats amb brots epidèmics (Schaes et al., 2002) com en els ramats amb infecció endèmica, on les vaques infectades congènitament són més susceptibles a patir avortaments durant la primera gestació (Dubey i Lindsay 1996) i hi ha repetició d'avortaments (Anderson et al., 1995; Pabón et al., 2007).

El clima, específicament les altes temperatures han demostrat tenir efectes negatius sobre la fertilitat de les vaques (Wolfenson et al., 1997), però són escassos els estudis sobre els efectes del clima en el fetus. S'ha pogut determinar que l'estació de l'any influeix sobre la gestació i estudis previs a Alemanya i Itàlia varen observar relació entre factors climàtics, com períodes de pluja i la temperatura, que poden estar relacionats amb la infecció i els avortaments per *Neospora*. També es podrien associar al desenvolupament dels ooquistes en el medi ambient (Bartels et al., 2006). En aquest mateix aspecte, en zones àrides d'Espanya hi ha una clara relació d'avortaments amb la presència de pluges degut a les conseqüències que comporten com poden ser canvis sobtats en les humitats dels farratges, ingredients de la ració i males condicions del jaç (López-Gatiús et al., 2005a).

Neospora caninum afecta tant al boví de llet com el de carn (Hoar et al., 1996; Waldner et al., 1998; Waldner et al., 1999). Els avortaments que causa el paràsit poden ser esporàdics, epidèmics o endèmics (McAllister et al., 1996; Moen et al., 1998; Wouda et al., 1998).

Les vaques amb anticossos de *N. caninum* són més propenses a patir avortaments que les vaques seronegatives (Thurmond and Hietala, 1997a; Moen et al., 1998; Wouda et al., 1998; López-Gatiús et al., 2004a).

La transmissió transplacentària de *N. caninum* pot tenir lloc durant diverses gestacions en el mateix animal (Anderson et al., 1997; Schaes et al., 1998, Fioretti et al., 2003; Pabón et al., 2007). En boví, *N. caninum* és molt eficient en quant a la

transmissió vertical, amb nivells fins al 95% de transmissió (Davison et al., 1999, López-Gatius et al., 2004a). De fet, durant anys, es va creure que aquesta era l'única via de transmissió del paràsit. Tot i això, des del moment que es varen començar a registrar avortaments epidèmics deguts a *N. caninum*, es va sospitar de la possibilitat de transmissió horitzontal (Yaeger et al., 1994; McAllister et al., 1996, 2000). La transmissió horitzontal sembla ser necessària per introduir noves infeccions al ramat (Thurmond et al., 1997b; French et al., 1999).

Tal i com ja s'ha indicat, pel que fa a estudis concrets en boví d'aptitud càrnia realitzats a nivell mundial són escassos. No obstant això, s'ha descrit l'existència de casos clínics i s'ha indicat que, igual que en el boví de llet, la infecció per *N. caninum* és causa d'importants pèrdues de la producció (McAllister et al., 1996; De Meerschman et al., 2002; Waldner et al., 1998; Waldner et al., 1999). A Espanya, l'estudi epidemiològic basat en un mostreig transversal de ramats de boví d'aptitud càrnia (Quintanilla-Gozalo et al., 1999), va mostrar una taxa d'infecció del 55.1% en els ramats bovins de carn. En el recent estudi de Bartels et al., (2006) s'han observat seroprevalències similars en ramats bovins de carn a Galícia amb valors del 46% (95% interval de confiança: 41-51%).

Cicle selvàtic.

Diversos estudis han evidenciat la presència d'anticossos i per tant de contacte amb *N. caninum* en una gran varietat d'espècies silvestres com en el cérvol de cua negra i blanca, cérvol roig, cabirol, búfal d'aigua, búfal africà, zebres, camells, rinoceronts, (revisat Dubey, 2003; Ferroglio et al., 2003, Soldati et al., 2004) alzes (Gondim et al., 2004), en biso americà i caribú (Dubey y Thulliez, 2005) així com també en espècies de zoològic (Sedlak and Bartova, 2006). També s'ha detectat presència d'anticossos en diferents carnívors silvestres: coiots (Lindsay et al., 1996), dingos (Barber et al., 1997), guineus roges i grises (Barling et al., 2000; Schares et al., 2001) suggerint un paper dels caníds silvestres en la epidemiologia de la neosporosis. Per altre banda, també s'ha indicat que la exposició de coiots o guineus grises és un factor de risc d'infecció (Barling et al., 2000).

S'ha detectat eliminació d'ooquistes pel coirot (Gondim et al., 2004) i més recentment per guineus vermelles del Canadà (Wapenaar et al., 2006) indicant que els cànids silvestres poden actuar com a HD, mantenint un cicle selvàtic de la infecció (Almería et al., 2002).

A Amèrica del Nord el cérvol de cua blanca és considerat com el principal reservori de *N. caninum*, ja que el paràsit s'ha aïllat en aquesta espècie (Gondim et al., 2004b; Vianna et al., 2005). És d'interès el fet que gossos als quals se'ls havia donat cervells de cérvols de cua blanca infectats de manera natural, varen eliminar ooquistes (Gondim et al., 2004b), conclouent que la transmissió selvàtica entre cérvols i cànids és possible i implica l'existència de cicles selvàtics del paràsit (Barling et al., 2000; Lindsay et al., 2001, Gondim et al., 2004b, Rosypal and Lindsay, 2005). A Espanya es va poder observar la presència d'anticossos enfront de *N. caninum* en un 11,8 % de 237 cérvols rojos, 7,7% de 13 aruis, 6.1% de 33 cabirol i en el 0,3% de 298 senglars (Almería et al., 2007). Aquests resultats poden tenir implicacions importants en el cicle del paràsit, ja que poden influir en els nivells de prevalença d'infecció del paràsit en les explotacions de boví en zones compartides.

Patogènia i lesions

La ràpida multiplicació intracel·lular de taquizoïts de *N. caninum* porten a mort cel·lular que pot arribar a manifestar-se macroscòpicament, amb àrees visiblement necròtiques en pocs dies (Lindsay et al., 1999). Els taquizoïts es troben principalment al cervell i teixit neuronal, on poden arribar a destruir gran nombre de neurones, incloent les neurones dels nervis cranials i espinals (Barber et al., 1996; Lindsay et al., 1999). La lesió característica de neosporosis al SNC és un focus de cèl·lules mononuclears infiltrades al voltant d'una àrea central amb necrosis. Els taquizoïts també afecten la conductivitat de les cèl·lules infectades, i poden produir malaltia neuromuscular severa en gossos, bovins i probablement altres hostes (Dubey and Lindsay., 1996). Els quists

tissulars de *N. caninum* no s'acostumen a associar a lesions (Wouda et al., 1997). Es desconeix quant de temps poden romandre els quists al SNC, però se sap que en ratolins i de manera experimental han estat viables durant un mínim d'un any (Lindsay et al., 1992).

Dels casos que s'han descrit de lesions en gossos, la majoria són lesions al SNC (Figura 4) i al sistema nerviós perifèric, seguides per lesions musculars, hepàtiques i en d'altres teixits (Barber et al., 1996; Dubey and Lindsay., 1996).

Tot i que no s'ha aconseguit observar quists en teixit muscular post-infecció experimental (Dubey et al., 2002) recentment s'han descrit quists de paret molt prima, amb gruixos de 0.3-1.0 μm a múscul de boví i de gos post-infecció natural (Peters et al., 2001; Dubey, 2003).

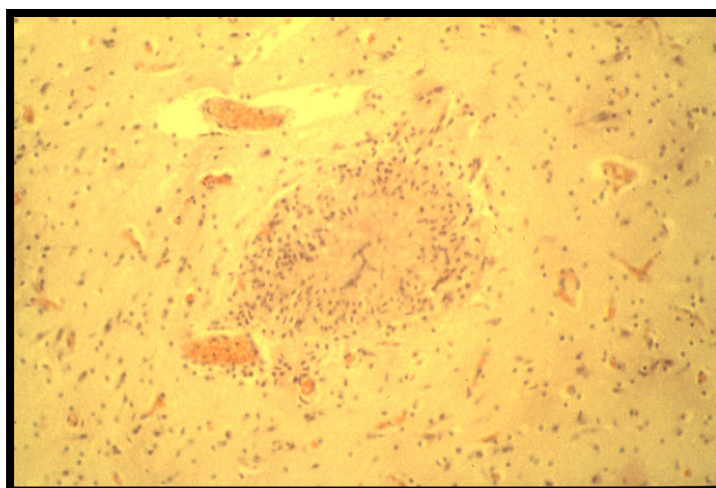


Figura 4. Focus de necrosis i inflamació focal no supurativa a SNC causada per *Neospora*. Foto cedida per J.P Dubey

Els fetus bovins avortats, sovint estan autolítics o momificats (Figura 5), fet que en complica l'exploració. Les lesions macroscòpiques no són freqüents però es poden trobar focus pàl·lids a la musculatura esquelètica i cardíaca, i també focus que poden ser pàl·lids o foscos al cervell (Dubey and Lindsay, 1996). En un estudi de neosporosis fetal bovina, s'hi van trobar lesions histològiques al cervell, cor i fetge en el 91% dels 80 casos observats (Wouda et al., 1997). També es poden trobar lesions degeneratives i

inflamatòries a la musculatura esquelètica i altres teixits fetals (revisat per Dubey and Lindsay, 1996).

En l'anàlisi de com es produeix la infecció i la mort fetal, s'esdevenen diferents hipòtesis lligades al període de la gestació en el qual es dona la transmissió de la mare al fetus (com a conseqüència de la reactivació d'una infecció latent) i a la resposta immune materna. Tal vegada, la manifestació de la infecció depèn de l'edat fetal i, possiblement també, del grau i la durada de la parasitemia, i a les característiques de l'aïllat infectant (Innes et al., 2000, Innes et al., 2002; Buxton et al., 2002).

El complex procés d'invasió cel·lular entre els apicomplexe, és similar i inclou receptors de superfície i proteïnes de micronemes, roptries i grànuls densos que intervindran en l'adhesió a la superfície cel·lular i la formació de vacúols parasitòfors intracel·lulars i la seva maduració posterior (Naguleswaran et al., 2003).

Els detalls del procés d'invasió poden ajudar a explicar el perquè algunes cèl·lules són més susceptibles que d'altres a la invasió per *Neospora* i perquè algunes espècies com els cànids i remugants d'aptitud lletera són més susceptibles a la infecció (Buxton et al., 2002).

Per intentar explicar la presència d'avortaments deguts a *Neospora* cal buscar-ne les seves causes tant en les lesions que causa directament el paràsit a la placenta i el fetus, impedit-ne la supervivència; així com en l'alliberació de prostaglandines que provoquen luteolisi i posterior avortament, o també per l'alliberació de citoquines pro-inflamatòries que provoquen l'expulsió fetal. Totes aquestes causes, relacionades entre elles, són més o menys importants segons el període de gestació en què s'esdevenen (Dubey et al., 2006).

La maduresa del sistema immune fetal es dona progressivament a mesura que va avançant la gestació. A partir dels dies 100 a 150, el fetus és capaç de començar a

desenvolupar una resposta immune que es fa més competent passat el dia 150 de gestació, quan el fetus és capaç de reconèixer i respondre a alguns patògens.

Estudis en femelles gestants han indicat una alta susceptibilitat del fetus immadur a la multiplicació de *N. caninum*, i que aquest fenomen està altament relacionat amb la presència de l'avortament i el període de gestació (Quintanilla-Gozalo et al., 2000, Williams et al., 2000).

A partir del segon terç de gestació i tot i que el fetus desenvolupa resposta immunitària, no és suficient; ja que és en aquest període quan es registren més avortaments associats a *Neospora* i els que arriben a tercer trimestre de gestació neixen viables però infectats (Pereira-Bueno et al., 2003).

Tant en infecció experimental com en infecció natural, la invasió de *Neospora* a l'úter i la seva multiplicació intra-cel.lular provoca focos de necrosi en els teixits de la mare i el fetus a l'interfase materno-fetal, donant un inici de resposta inflamatòria. Des d'aquest punt, la lesió s'extén al corioalantoides (membrana placentària del fetus), entre els cotiledons, tot i que es desconeix si la majoria de lesions són causa directa del paràsit o de les respostes immunitàries materna i fetal (Buxton et al., 2002).

Tant letal com les lesions a la placenta i la inflamació dels teixits de la mare i el fetus, ho és el pas de *Neospora* a la circulació fetal i la invasió dels seus teixits, principalment el SNC, on inicialment es localitza al voltant dels vasos sanguinis causant destrucció del neuropoli en els fetus menys desenvolupats. Els fetus més desenvolupats ja es poden defensar del paràsit, la multiplicació és més restringida i la necrosi es limita a focus amb reacció inflamatòria intensa. També es pot presentar una meningitis lleu i lesions a òrgans fetals com múscul esquelètic, cor, pulmó i fetge (Buxton et al., 2002).



Figura 5. Fetus avortat per *Neospora caninum*.

Immunitat

Les infeccions experimentals amb *N. caninum* no causen simptomatologia en bovins no-gestants, tampoc en algunes estirps de ratolins d'experimentació, fet que suggereix que el sistema immune d'aquests animals és perfectament capaç de controlar la infecció. S'ha comprovat que *N. caninum* desencadena tant la resposta immune humoral com la cel.lular en animals infectats (Lundén et al., 1998; De Marez et al., 1999). Provablement, la presència d'anticossos no implica el control de la infecció, que a la llarga depèn majoritàriament dels mecanismes de resposta immune cel.lular (Khan et al., 1997; Lundén et al., 1998). Tot i això els detalls del paper que representen els mecanismes immunes cel.lulars encara no es coneixen, el paper protector de les citoquines s'ha pogut observar en ratolins. Algunes estirps de ratolins presenten una resistència natural a *N. caninum* depenent de la interleucina-12 (IL-12) i l'interferó-gamma (Khan et al., 1997), el tractament amb aquestes mateixes citoquines incrementa també la resistència a d'altres estirps (Baszler et al., 1999).

Els mecanismes de transmissió congènita i avortament encara són poc coneguts, però s'ha observat que el sistema immune hi està relacionat i, tal i com succeeix amb altres protozoous intracel·lulars, a la resposta protectora hi predomina la resposta Th1 (Quinn et al., 2002).

La resposta immune protectora en neosporosi està determinada per les citoquines proinflamatories i per la resposta tipus Th1. La protecció de l' IFN- γ s'ha observat en vaques amb infecció natural on els nivells elevats IFN- γ s'han relacionat amb la inhibició de la transmissió congènita; per contra, en fetus amb nivells baixos d' IFN- γ s'han observat les lesions més severes després d'infeccions experimentals (Williams et al., 2000; Andrianarivo et al., 2001). Un estudi recent ha posat de manifest el paper protector de l' IFN- γ en animals infectats crònicament (Lopez-Gatius et al., 2007). Tot i que en alguns casos un excés d' IFN- γ en els fetus, probablement com a resposta a una infecció elevada en el fetus, també s'ha associat a avortaments (Almería et al., en preparació).

Per altra banda, respecte a la resposta humoral, els anticossos indiquen el contactes del sistema immunitari amb l'antigen, i nivells elevats d'anticossos reflexen una activitat i multiplicació de *Neospora* a l'hoste. Els nivells alts d'Ac durant la gestació s'han relacionat amb l'avortament, per tant, el seu estudi és de gran utilitat tant en el diagnòstic com en els anàlisis epidemiològics. Es coneix poc sobre la eficàcia de la funció protectora dels Ac, no obstant, prevenen de la infecció dels taquizoïts a les cèl·lules de l'hoste (Innes et al., 2002). A diferència de *T. gondii*, que estimula una resposta immune protectora després d'un primer contacte amb el paràsit i la aparició d'Ac protectors, amb *Neospora* no es desenvolupa aquesta resposta protectora, i si es produeix, es produeix en menor grau (Williams et al., 2003).

El desenvolupament d'una immunitat protectora no està del tot clar. Estudis amb infecció experimental en femelles gestants han permès observar que després de la infecció inicial i subseqüent avortament, es desenvolupa una resposta immune protectora que redueix el risc de futurs avortaments (McAllister et al., 2000) i posteriorment a l'exposició a *Neospora* els ramats infectats crònicament són menys susceptibles a avortar que els no-infectats (McAllister et al., 2000). Tot i això, aquesta

protecció és més eficient en femelles que es re-infecten amb ooquistes que en femelles on es reactiva la infecció (revisado Dubey, 2003) i la protecció no és suficient per evitar el pas de la infecció congènita (Innes et al., 2002). A més, la taxa d'avortaments repetits és elevada (Pabón et al., 2007).

La resposta immune humoral tant en vaques com en fetus sembla ser predominantment de tipus IgG2 (Andrianarivo et al., 2001) i els nivells d'anticossos en femelles gestants fluctuen, augmentant cap a la meitat de la gestació i estan lligats a la presència d'avortaments en aquest període (Guy et al., 2001; Quintanilla-Gozalo et al., 2000). No obstant, un estudi recent ha observat que aproximadament el 50% dels animals infectats crònicament presenta un pic d'Ac a la segona meitat de la gestació i l'altre 50% no (Nogareda et al., 2007).

La resposta humoral de fetus no prové de la mare, ja que no hi ha transferència d'Ac front *Neospora* via transplacentària.

Cal tenir en compte que la resposta immune té lloc en animals gestants, i que la resposta immune que s'esdevé durant la gestació, moment en el que es produeix la transmissió al fetus causant avortaments o transmissió vertical, és pràcticament desconeguda. A la gestació sembla que existeix una tendència a que la resposta immune sigui de tipus Th2, que s'ha vist associada a una implantació embrionària més favorable i a un manteniment de la gestació en les primeres etapes, mitjançant la supressió de respostes locals de tipus inflamatori (Wegman et al., 1993; Chaouat et al., 2002). No obstant, aquesta tendència cap a respostes de tipus Th2 que protegeix el fetus, també pot afavorir les infeccions per protozous i l'existència de transmissió vertical al fetus (Long i Baszler, 2000; Almería et al., 2003).

Quadre clínic de N. caninum en gossos

La majoria dels casos diagnosticats en gossos, són individus joves i que han estat infectats congènita. Desenvolupen parèsia de les extremitats posteriors i atàxia, que van esdevenint cada cop més severes (Dubey and Lindsay, 1993; Barber and Trees,

1996). Els gossos adults també poden patir la malaltia i manifestar-la clínicament; s'han observat signes clínics en un gos de 15 anys (Dubey et al., 1988). Un tractament anti-protozoari en un estadi molt recent de la infecció pot recuperar un 50% dels casos (Barber and Trees, 1996). Les gosses gestants transmeten via vertical el paràsit als seus fetus durant la gestació, i en successives gestacions (Barber i Trees, 1998).

Quadre clínic de N. caninum en els bovins

Els bovins adults no gestants, no presenten cap simptomatologia quan són infectats per *N. caninum*. L'avortament és el principal símptoma clínic associat a la neosporosi bovina en adults i s'han descrit quadres d'alteracions neuromusculars, postració i pes baix al naixement en vedells (Dubey et al., 2006). Com ja s'ha dit anteriorment, tant en bovins d'aptitud càrnia com en bovins d'aptitud lletera, els animals seropositius són més susceptibles a patir avortaments que els bovins seronegatius (Dubey y Schares., 2006).

Les vaques gestants poden avortar el seu fetus. Aquest avortament es pot produir si la infecció és recent, crònica o congènita (Thurmond and Hietala, 1997; Moen et al., 1998; Wouda et al., 1998). Les vaques infectades per *N. caninum* poden avortar en gestacions successives (Anderson et al., 1995; Thurmond and Hietala, 1997). Els avortaments associats a *N. caninum* poden tenir lloc en qualsevol moment de la gestació i poden incloure avortaments a terme i naixements prematurs (Anderson et al., 1995), tot i que s'observen majoritàriament a partir del 3r mes de gestació, i de forma més freqüent als mesos 5-6 de gestació (Anderson et al., 1991, 1995; Barr et al., 1991).

Els vedells infectats per *N. caninum* des del naixement poden néixer sans però infectats de manera persistent. Aquests vedells, en principi no semblaria que hagin de tenir cap desavantatge enfront vedells no infectats per *N. caninum*. Tot i això, alguns dels vedells infectats congènitament neixen vius però malalts, o emmalalteixen els 2 primers mesos de vida. El paràsit afecta el SNC, manifestant clars signes neurològics.

Tant les extremitats posteriors com les anteriors poden patir flexió o hiperextensió (Dubey, 2005). Els vedells poden patir postració, atàxia i/o pèrdua de propiocepció. Alguns dels vedells infectats poden tenir un pes considerablement disminuït. Existeix un petit nombre de vedells nascuts de vaques positives que són negatius a *N. caninum*. Cas de no desenvolupar la malaltia, els animals estaran clínicament sans però crònicament infectats.

Estudis en boví lleter han descrit casos d'animals seropositius que presenten una producció de llet inferior a l'esperada (Hobson et al., 2002; Hernández et al., 2001; Thurmond and Hietala, 1997).

Diagnòstic en casos d'avortament.

El diagnòstic de neosporosi és difícil degut a l'absència de signes clínics en els bovins infectats crònicament i el baix nombre de paràsits presents en els fetus avortats. Actualment, el diagnòstic en bovins adults es basa en la detecció d'Ac específics enfront a *Neospora*. En fetus, el diagnòstic es basa en les lesions histopatològiques en teixits del fetus avortats, juntament amb tècniques d'immunohistoquímica i PCR (Dubey et al., 2006).

La presència d'anticossos en sèrum enfront *N. caninum*, indica que l'animal està, o ha estat, infectat pel paràsit; però no que sigui la causa d'avortament. Els anticossos poden ser detectats per tests d'immunofluorescència indirecta (IFI) (Dubey et al., 1988), ELISA (Paré et al., 1995; Björkman et al., 1997) o per test d'aglutinació directa (Packham et al., 1998, Romand et al., 1998) o immunoblotting. El test ELISA d'avidesa pot ser útil per distingir entre infeccions recents i cròniques de *N. caninum* en bovins (Björkman i Uggla, 1999). En un estudi europeu recent (Von Blumröder et al., 2004), es va processar un mateix grup de sèrums amb diferents test ELISA comercials trobant elevada concordància entre ells. Recentment, s'han descrit tècniques ELISA per la detecció d'Ac en llet (Bjorkman et al., 1997; Schares et al., 2004). Les proves d'ELISA en llet permeten un anàlisi ràpid en un gran nombre d'animals, essent molt útil en estudis epidemiològics de ramats.

Per un diagnòstic definitiu de neosporosi, és necessari realitzar la necròpsia del fetus o del vedell. Cal recollir mostres, entre d'altres, de cervell, cor i fetge; i realitzar anàlisis anatomopatològics per observar possibles canvis; és a dir, lesions associades amb la parasitació (Dubey, 1999). També cal recollir mostres de fluids corporals o sèrum, per a detecció d'anticossos (Björkman i Uggla, 1999). Tot i això, per tal d'establir un diagnòstic definitiu, cal observar el paràsit en el teixit. Tot i que els quists de *N. caninum* presenten una paret més gruixuda, no es pot diferenciar d'altres espècies d'Apicomplexa per tècniques estàndard d'histologia, però sí per immunohistoquímica (IHC) (Lindsay i Dubey, 1989). Amb aquesta tècnica, el paràsit queda marcat selectivament gràcies a l'ús d'anticossos específics per *N. caninum*, inclús en mostres amb certa autòlisi (revisat Dubey, 2005). Tot i això, la quantitat d'organismes de *N. caninum* presents a les mostres acostuma a ser molt baix i de manera focal, fins i tot al SNC dels animals infectats. Per tant, la sensibilitat de detecció del paràsit, és baixa (Dubey, 1999; Thurmond et al., 1999).

El DNA de *N. caninum* es pot detectar per la tècnica de reacció en cadena de la polimerassa (PCR). S'han descrit molts mètodes per al diagnòstic (Holmdahl i Mattsson, 1996; Gottstein et al., 1998; Ellis, 1998; Baszler et al., 1999).

Es recomana l'ús de diverses d'aquestes tècniques de diagnòstic de manera conjunta (Pereira-Bueno et al., 2003).

El desenvolupament recent de la PCR quantitativa ha permès avaluar l'acció terapèutica de tractaments i vacunes (Dubey y Schares et al., 2006). També ha estat d'utilitat diagnòstica per determinar la càrrega parasitària en semen de braus positius a *N. caninum* (Caetano-da-Silva et al., 2004).

La presència d'anticossos de *N. caninum* en fluids corporals o sèrum d'un fetus o un vedell pre-calostat indica infecció congènita. No obstant, l'absència d'Ac de *N. caninum* no exclou de la possibilitat que l'animal pateixi neosporosis. El fetus podria no ser immunocompetent en el moment de la infecció, o bé, el temps entre la infecció de la mare i l'avortament o el naixement del vedell podria haver estat massa curt per a que es poguessin produir Ac (Wouda et al., 1997).

Es pot realitzar un cultiu i aïllament del paràsit, però a efectes pràctics és poc útil. El cultiu *in vitro* de *N. caninum* s'ha assajat amb varietat de tipus cel.lulars. En els cultius cel.lulars, normalment el que s'observa són els taquizoïts (Dubey et al., 1988). Recentment, hi ha estudis que han demostrat la possibilitat de desenvolupar bradizoïts en cultius cel.lulars en condicions extremes de cultiu (Weiss et al., 1999).

Diagnòstic diferencial.

Neospora caninum està altament relacionat amb altres apicomplexa com *T. gondii* y *Sarcocystis spp.* que també poden produir avortaments en boví, però no se solen presentar reaccions creuades i es poden diferenciar amb IHC i PCR. A més, la infecció per *T. gondii* és poc freqüent en bovins y *S. cruzi* es localitza principalment a l'endoteli vascular i és poc freqüent que es localitzi a cervell (Dubey, 2005).

Entre els agents vírics relacionats amb avortaments cal incloure l' IBR o BoHV-1, IPV o BoHV-2, BHV-4 i BVD. De fet, alguns estudis han observat associació entre la presència d'Ac a BVD i *Neospora* (Bjorkman et al., 2000).

També cal diferenciar la neosporosi d'agents bacterians com *Brucella spp*, *Actinomyces pyogenes*, *Staphylococcus sp.*, *Escherichia coli*, *Campylobacter foetus*, *Salmonella sp.*, *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp*, *Leptospira hardjo*, *Listeria monocitogenes*, *Chlamydia sp* entre altres; així com també causes no-infeccioses d'avortament, tenint sempre present que un alt percentatge de casos acaben amb un diagnòstic desconegut (Wouda., 2006).

Control epidemiològic i reproductiu de la infecció

Per controlar la malaltia en els ramats bovins, que presenten pèrdues econòmiques importants i on no hi ha un tractament eficaç, es fonamental prevenir la propagació de la infecció evitant tant la transmissió horitzontal com vertical; per tant, cal que aquestes explotacions es basin en el control dels animals positius a la infecció.

És necessari conèixer la prevalença de seropositivitat del ramat. Si la seroprevalença del ramat és prou baixa i el cost econòmic d'eliminar els animals seropositius és assumible pel ramader, aleshores és molt recomanable eliminar aquests animals de l'explotació (French et al., 1999). Aquesta mesura dràstica ha estat molt efectiva en el control de la neosporosi de ramats on hi predomina la transmissió vertical (Hall et al., 2006). En el cas contrari, seroprevalences altes i/o impossibilitat d'assumir el cost econòmic que representa eliminar animals productius de l'explotació, cal controlar les mares que són seropositives o que hagin avortat i controlar també la seva descendència, sobretot futura reposició (vedelles de recia).

La infecció congènita de vedelles filles de mares seropositives o amb historial d'un o més avortaments pot ser detectada per serologia precalostrament. Aquest control serològic es repetirà, sempre que sigui possible, quan les vedelles de reposició tinguin almenys 6 mesos. Una altra mesura de control de la infecció congènita, més econòmica i radical, és la d'adoptar criteris de selecció de la reposició que descartin com a futures mares, les vedelles nascudes de vaques seropositives i/o amb un historial reproductiu que presenti avortaments, reabsorcions embrionàries, mornats, etc. A més, és interessant esbrinar l'HD responsable de la infecció. Un cop descobert l'HD, cal reduir al màxim l'accés dels gossos a teixits possiblement infectats pel paràsit; cal eliminar el més aviat possible els fetus avortats, placentes, vaques mortes, mortinats... i dur a terme pràctiques d'higiene estrictes en el maneig dels parts (eliminar restes de sang, secundines, etc).

La possibilitat de cicles silvestres també fa important evitar el contacte de tots aquests teixits possiblement infectats amb carnívors silvestres. Aquest darrer punt és especialment important per a controlar la malaltia a llarg termini i com a rutina de treball de l'explotació (French et al., 1999).

Una mesura que pot ser adoptada en animals de valor elevat, ja sigui des del punt de vista productiu o genètic, és la transferència d'embrions d'animals seropositius a femelles "dida" seronegatives (Baillargeon et al., 2001; Bielansky et al., 2002).

Una altra mesura interessant és la inseminació de boví lleter amb semen de races de carn. La inseminació amb semen d'aptitud càrnia de vaques lleteres seropositives, a

més d'evitar deixar reposició de mares seropositives al ramat, s'ha demostrat que redueix significativament les pèrdues de gestació d'aquestes vaques (López-Gatius et al., 2005b).

Els models matemàtics utilitzats per avaluar les mesures de control en el temps han indicat que el mostreig anual i l'eliminació d'animals seropositius redueix ràpidament la seroprevalença del ramat però, descartar les femelles amb ascendència positiva és, a llarg termini, la mesura de control més rendible econòmicament (Hasler et al., 2006a; Hasler et al., 2006b). Altres mesures, com l'administració de quimioteràpia en vedells descendents de vaques seropositives i la vacunació d'animals susceptibles i infectats, són eficients però no tant com l'eliminació selectiva d'animals (Hasler et al., 2006a; Hasler et al., 2006b). Igualment succeeix amb l'aplicació de models matemàtics en ramats de boví de carn, ja que s'ha observat que el mostreig anual de tot el ramat i l'eliminació de les femelles amb ascendència positiva és altament efectiva en el control de la neosporosi (Larson et al., 2004).

Actualment existeix una vacuna comercial a Estats Units, però la seva eficàcia en la prevenció d'avortaments deguts a *Neospora* no és clara. A més, no permet distingir entre animals vacunats i animals infectats (revisado Dubey, 2005; Innes et al., 2002).

HIPÒTESI DETREBALL.

La majoria d'estudis sobre *N. caninum* han estat realitzats en bovins d'aptitud lletera (indirectament això implica majoritàriament la raça Holstein). Tot i això, s'han referenciat alguns casos d'avortaments i mortalitat neonatal en bovins d'aptitud càrnia a Austràlia, Canadà, Estats Units i Bèlgica (revisió Dubey, 2003) que, igualment als bovins d'aptitud lletera, signifiquen pèrdues econòmiques importants per a la producció bovina d'aptitud càrnia (McAllister et al., 1996; De Meerschman et al., 2002; Waldner et al., 1998; Waldner et al., 1999). Comparativament, però, hi ha poc coneixement de com actua la malaltia en els bovins d'aptitud càrnia, especialment en sistemes semi extensius i zones de muntanya. A dia d'avui, i que coneguem, no hi ha cap estudi realitzat.

Des que es va descobrir aquest paràsit, fa aproximadament 20 anys, s'han fet molts avenços per tal d'entendre la seva biologia i patologia. En aquesta tesi doctoral, l'atenció principal està focalitzada en com actua la infecció per aquest paràsit en casos de bovins d'aptitud càrnia sotmesos a un sistema de producció sem iextensiu d'alta muntanya.

Aquest treball té com a principal objectiu analitzar la situació actual de la neosporosi al Principat d'Andorra, àrea geogràficament molt tancada, on el trànsit d'animals entre països veïns és molt reduït i amb maneig extensiu, que amb les dades anteriors permetrien esperar taxes d'infecció relativament baixes. Un altre objectiu va ser analitzar quins factors de risc epidemiològic tenen incidència significativa sobre la seropositivitat a *N. caninum* dels bovins i aprofitar aquesta informació per aplicar un programa de control i possible eradicació del paràsit al Principat d'Andorra.

Durant aquests anys de treball s'han utilitzat eines diagnòstiques, com l'histopatologia i la PCR, que han suplementat la serologia, per tal de confirmar casos positius d'avortaments i seroconversions. Aquestes eines diagnòstiques han estat molt útils per a la realització d'aquest treball però també per millorar dia a dia els problemes reproductius i obstètrics de les explotacions.

MATERIALS I MÈTODES.

Localització de l'estudi: PRINCIPAT D'ANDORRA.



El Principat d'Andorra està situat en plena serralada dels Pirineus, entre dos grans estats: Espanya (límits Sud i Oest) i França (límits Nord, Est i Oest). És un país d'alta muntanya, amb sis valls que configuren un relleu força accidentat, de 65 cims i pics elevats per sobre dels 2.500 m, i valls estretes amb vessants de forts pendents i capçaleres amples on hi abunden llacs d'origen glacial. Hi ha tres rius d'importància: Valira del Nord, Valira d'Orient i Gran Valira, i tota una xarxa de rius i rierols que fan que sigui un país amb abundants recursos hídrics. L'altitud mitjana del país és de 2.000 m i oscil·la entre els 838 m (Frontera amb Espanya) i els 2.942 m (Pic del Comapedrosa). Té una superfície de 468 km². El punt més distant entre les dues fronteres és de 42 Km.

La superfície cultivada ocupa 20 Km². Prats d'alta muntanya, boscos i muntanyes conformen 374 Km². Els 75 Km² restants estan urbanitzats.

Presenta un clima molt variable, amb una temperatura mitjana anual d'entre 5°C i 10°C (24°C a l'estiu i -2°C a l'hivern), amb precipitacions mitjanes de 800 mm/m², de distribució irregular i amb una innivació del 20-25%.

La població d'Andorra la formen 65.000 habitants aproximadament.

L'agricultura, degut a les característiques geogràfiques del país, mai ha superat el 8% de l'extensió del territori. El cens de bovins adults al Principat d'Andorra és de 1.200 caps aproximadament. La ramaderia andorrana se centra en les espècies bovina, equina, oví i cabrum. La importància de la ramaderia andorrana a l'economia del país és baixa, cal destacar que la importància de la ramaderia sobre l'economia del país ha passat del 90% l'any 1950 fins a ser inferior a l'1% a l'actualitat. En la majoria de les explotacions només representa una font suplementària d'ingressos per a les famílies. El principal motor econòmic del Principat és el turisme.

El Principat d'Andorra està dividit administrativament en 7 Parròquies autònomes: Canillo, Encamp, Escaldes- Engordany, La Massana, Ordino, Sant Julià de Lòria i Andorra la Vella. La capital política del país és Andorra la Vella (Figura 6).



Fig. 6. Mapa del Principat d'Andorra.

Dades de la població estudiada i el seu estatus productiu:

Animals sotmesos a estudi

Els animals sotmesos a estudi pertanyen a explotacions ramaderes de les parròquies de Canillo, Encamp, Ordino, La Massana i Sant Julià (Taula 1).

	CANILLO	ENCAMP	ORDINO	LA MASSANA	SANT JULIÀ	TOTAL
	Mostres	Mostres	Mostres	Mostres	Mostres	
2001	122	75	0	0	0	197
2002	217	186	58	0	0	461
2003	258	193	49	0	0	500
2004	191	193	66	84	15	549
2005	10	1	40	0	0	51
TOTAL	798	648	213	84	15	1758

Taula 1. Mostres recollides a cada parròquia d'Andorra per any d'estudi.

Les parròquies de Canillo i Encamp són les àrees on s'han pogut obtenir més mostres i s'han pogut incloure més animals a l'estudi, perquè conformen la meua àrea habitual de servei veterinari. Les mostres que han estat extretes d'altres parròquies s'han estudiat per interès clínic veterinari (problemes reproductius) i/o interès del ramader per instaurar un pla de lluita contra la neosporosi en el seu ramat.

Sistema productiu del Principat d'Andorra

Històricament, el sistema d'explotació ramadera extensiva ha estat el de transhumància. Per diferents motius, aquest sistema s'ha anat perdent i, a l'actualitat, la gran majoria dels bovins andorrans romanen tot l'any al Principat i de manera extensiva durant gran part de l'any.

A finals de primavera, els ramats pasturen en prades alpines i boscos comunals (1.600m a 2.300m) agrupats en les diferents “vacades” (conjunt de tots els ramats pertanyents a una parròquia) -de principis de juny a finals d’octubre-. Durant aquests mesos, cada parròquia separa les femelles d’edats compreses entre 6 i 26 mesos, que pasturen en d’altres territoris comunals però sense la presència de mascles reproductors, a fi d’evitar cubricions tempranes no desitjades.

Els animals baixen als prats de pastura de les diferents finques a finals d’octubre fins a principis de desembre. L’establució es limita a mesos de més fred, de desembre a finals de març, única època de l’any en què la nutrició és únicament a base de farratges. Finalment, de finals de març fins a principis de juny els animals tornen a aprofitar les pastures de la finca.

L’estacionalitat de parts en aquest sistema productiu, tot i que s’intenta reduir per interessos de producció, és elevada, centrant-se sobretot a finals d’hivern i primavera.

Aquest sistema de producció fa que durant certes èpoques de l’any el maneig dels animals i la gestió dels avortaments que puguin patir les mares sigui difícil.

El bestiar està sotmès a una campanya de sanejament anual (Brucel·losi, Tuberculosi i Leucosi) i es desparasita 2 cops l’any amb doramectina (Dectomax®, Pfizer). Els animals es vacunen amb una vacuna tetravalent contra PI-3, IBR, BVD, Virus Sincitial (Cattlemaster-4®, Pfizer), contra Rotavirus, Coronavirus i *Escherichia coli* (Dyavac®, Laboratorios Syva) i contra enterotoxèmia (Miloxan® Merial). Qualsevol tractament veterinari a què és sotmès un animal queda registrat en una fitxa individual de tractament veterinari.

Els animals sotmesos a estudi presenta les següents pautes vacunals:

- Animals adults i reposició: Miloxan® (Merial), Cattlemaster® (Pfizer), Dyavac®(Syva). Vacuna i revacuna. Vacunació semestral.
Primovacunació: 6 setmanes de vida.
- Vedells d'engreix: Miloxan® (Merial), Cattlemaster® (Pfizer). Vacuna i revacuna. Vacunació semestral.

Per les característiques d'aquest sistema productiu, aquests bovins estan durant 9-10 mesos de l'any en contacte directe i indirecte amb gran varietat d'animals d'altres espècies, ja siguin domèstiques o salvatges. És d'interès, en aquest cas, remarcar l'estret contacte que els bovins mantenen amb gossos (d'atura, de caça, de companyia, de mushing, assilvestrats) i guineus.

Des de fa 10 anys, la cabana bovina del Principat d'Andorra està en una situació estable tant en nombre d'animals com en moviments trans fronterers (transhumància, compravenda). Hi ha un moviment mínim de bovins entre parròquies (compravenda o lloguer de pastures), no hi ha exportació d'animals i la importació de bovins vius per a producció també és pràcticament nul·la. Tot animal importat és sotmès a una revisió veterinària que inclou períodes de quarantena, tuberculinització i controls serològics (brucel·losi, leucosi, IBR, BVD, neosporosi). Gairebé totes les explotacions d'Andorra se sustenten amb la seva pròpia reposició.

Des de l'any 2000, Andorra sotmet a tots els bovins de raça bruna a un programa de millora genètica per tal de millorar la raça Bruna d'Andorra i millorar-ne la seva adaptació al medi.

Tota la cabana bovina d'Andorra, està sotmesa a un rigorós control sanitari i de qualitat tant dels animals vius com del producte final, ja que estan sota el segell oficial de Carn de Qualitat d'Andorra. L'any 2001, es va a començar l'anàlisi dels animals per infecció de *N. caninum*.

Mostreig i processament de dades

Les dades dels animals es van recopilar informàticament i de manera individual del ramat, utilitzant el cròtal d'identificació oficial de la UE. Les dades de cada animal monitoritzat van ser les següents: Any de naixement de l'animal, país d'origen, n° de cries (sempre que ha estat possible), estat reproductiu al moment de la recollida de mostres, número de cròtal de la seva descendència, raça, resultats de les serologies realitzades, nombre d'avortaments patits, historial de patologia reproductiva i obstètrica, historial de sanejament.

Mostres serològiques:

Animals

L'obtenció de mostres va començar la campanya de sanejament de l'any 2001.

Es van recollir mostres de sang de tots els individus adults majors de 6 mesos d'edat, ja que animals més joves podrien tenir anticossos maternals. Els mostrejos varen coincidir amb les campanyes de sanejament ramader (setembre-novembre) moment en el qual va ser possible la presa de mostres de tots els animals. Els braus i alguns gossos de les diferents explotacions també van ser analitzats.

La sang es va extreure amb Vacutainer®, de la vena caudal. En gossos la extracció es va fer a través de la vena cefàlica. Es va conservar refrigerada 4°C fins arribar al laboratori, on se'n va extreure el sèrum per centrifugació a 1.000 g durant 15 min. Aquest sèrum es va congelar immediatament a – 45 °C fins el dia de ser sotmesa a diagnòstic per la tècnica d' ELISA indirecta.

Tècnica de ELISA indirecta

L'anàlisi dels sèrums obtinguts va ser realitzat mitjançant el kit comercial CIVTEST™ bovis NEOSPORA (Laboratoris Hipra, S.A., Girona, Espanya) per a la valoració d'anticossos contra *N. caninum* dels sèrums. És un test basat en enzim-immunoassaig indirecte.

L'antigen utilitzat a l'ELISA indirecta s'obté a partir de lisats de suspensions de taquizoïts de *N. caninum*. L'antigen està adsorbit a les plaques mitjançant mètodes convencionals. Tots els sèrums s'analitzen a dil.lució 1:100. Com a conjugat s'utilitza un anticòs monoclonal conjugat a peroxidasa. A cada analítica, s'utilitzen els controls – i + inclosos al test per validar-lo. Es fan servir dos solcs com a controls positius (CP) i dos com a controls negatius (CN).

El test és vàlid si la mitjana DO₄₀₅ dels CP és >0.9 i la mitjana DO₄₀₅ del CP sigui ≥ 5 vegades la mitjana DO₄₀₅ del CN. Els càlculs per a la interpretació dels resultats s'obtenen a partir d'un IRPC (Index Relatiu Per Cent), a través de la següent formula:

$$\text{IRPC} = \frac{(\text{DO}_{405} \text{ Mostra} - \text{Mitjana DO}_{405} \text{ Control Negatiu})}{(\text{Mitjana DO}_{405} \text{ Control Positiu} - \text{Mitjana DO}_{405} \text{ Control Negatiu})} \times 100$$

La interpretació dels resultats es mostra a la taula 2.

MOSTRA	VALOR IRPC
NEGATIU	≤ 6.0
DUBTÓS	6.0– 10.0
POSITIU	>10.0

Taula 2: Interpretació del resultats serològics amb ELISA CIVTEST segons les recomanacions del fabricant.

La prova presenta una especificitat del 94.7% i una sensibilitat del 83.3% (Rebordosa et al., 2000). La prova va ser validada al nostre laboratori mitjançant una comparació amb altres tècniques ELISA (Lopez-Gatius et al., 2004a). Un estudi comparatiu recent indica una especificitat i sensibilitat d'acord a d'altres proves serològiques (Von Blumröder et al., 2004).

En l'anàlisi serològic dels gossos mostrejats es va fer servir la tècnica de Immunofluorescència indirecta (IFI) amb conjugat anti-gos (Ortuño et al., 2002).

Mostres histològiques

Animals

En tots els casos d'avortaments en què s'ha pogut per facilitat de maneig, es van recollir mostres tant del fetus avortat com de la femella que havia patit l'avortament. Les mostres que s'obtenien en aquests casos són les reflectides a la taula 3.

Les tècniques diagnòstiques utilitzades per al diagnòstic de neosporosi han estat: Tècniques histològiques convencionals (H/E), immunohistoquímiques (IHC) i PCR.

	IMMUNOHISTOQUÍMICA H/E	PCR
FETUS AVORTAT	SNC, pulmons, fetge, cor	SNC
VACA ADULTA	Placenta (cotiledons),	-

Taula 3. Mostres recollides en casos d'avortament i tècnica utilitzada per la seva anàlisi.

Sempre que era possible, aquest mostreig anava acompanyat d'una serologia addicional tant de la vaca adulta com del fetus avortat per tal de determinar el nivell d'anticossos enfront *N. caninum* just al moment que s'havia produït l'avortament.

Tècnica de PCR

La obtenció de part del SNC (cervell i cerebel) del fetus avortat es realitzava el mateix dia de l'avortament. S'utilitzava una serra específica per a tècniques de traumatologia de petits animals prèviament esterilitzada, una fulla de bisturí estèril i d'un sol ús, guants de làtex estèrils i dos pots estèrils de recollida de mostres.

Com a mesura de seguretat, la massa encefàlica extreta, es dividia en dues parts i cadascuna es conservava en un pot estèril a -45°C fins a l'enviament al laboratori, durant el qual es conservaven les condicions de congelació. L'enviament de les mostres es feia per separat amb l'únic objectiu de disminuir riscos de pèrdua o desperfectes de la mostra.

Les mostres de DNA s'obtenien a partir de teixits de SNC del fetus avortat. S'homogeneïtzava la meitat del cervell i es va obtenir el DNA a partir de 4 alíquotes cada una de 0.5-1 gr de teixit. Després de lisar els eritròcits, les mostres van ser incubades en un buffer de proteïnassa K i extractades amb fenol-cloroform-isomyl alcohol. El DNA es va precipitar amb etanol i resuspès en Tris-EDTA (TE). Les mostres es van usar a la PCR en 1 µl DNA per 50 µl de reacció de PCR. La reacció va a ser duplicada per cada alíquota processada de DNA.

Per al diagnòstic de *N. caninum* basat en la tècnica de PCR s'ha seleccionat la regió genòmica específica Nc5 com a seqüència objectiu de l'amplificació de DNA (Kaufmann et al.,1996; Yamage et al.,1996). Els primers que s'han utilitzat són Np21-plus i Np6-plus (Liddell et al., 1999). Es van realitzar un mínim de dos PCR per cada alíquota, que es van processar de manera separada. La reacció de PCR es va realitzar segons la descripció de Liddell et al. (1999), amb mínimes modificacions.

El producte amplificat es va analitzar per electroforesi en gel d'agarosa al 2%. Aquesta PCR és capaç de detectar 1 únic taquizoït a las mostres analitzades (Almería et al., 2002).

Les mostres de control positiu per *N. caninum* (DNA de taquizoïts de NC-1) van ser cedides pel Dr. L.M.Ortega (Universitat Complutense de Madrid). Com a control negatiu es van realitzar reaccions de PCR sense DNA per evidenciar que no hi hagués contaminacions en la reacció de PCR.

Anàlisi histopatològic i immunohistoquímic

L'examen histopatològic i immunohistoquímic ha estat realitzat per la Unitat d'Anatomia Patològica de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona. Per a l'examen histològic dels teixits en formol es deshidraten, es parafinen i se seccionen en 5 µm. Posteriorment, es tenyeixen amb hematoxilina-eosina. A les seccions que s'apreciaven lesions a l'examen histològic, es procedia a realitzar una immunotinció, segons la tècnica de Lindsay y Dubey, (1989) utilitzant sèrum policlonal de conill enfront *N. caninum*, cedit generosament pel Dr. Dubey (USDA, Beltsville, MD, USA). A cada procediment s'inclouïen mostres control positives enfront a *N. caninum* i mostres control negatives.

Anàlisi estadística

Per analitzar els factors que poden influir significativament en la prevalença de neosporosi en bovins del Principat d'Andorra es van incloure les següents variables en l'anàlisi de regressió:

- Variable dependent: Resultat ELISA positiu enfront de *Neospora*.
- Variables independents:
 - Any del mostreig.
 - Parròquia.
 - Edat al mostreig: Variable numèrica. Edat categoritzada (0= Edat inferior a 4 anys; 1= Edat major o igual a 4 anys).
 - Propietari.
 - Sexe.
 - Raça.
 - Nacionalitat: País de naixement.

L'anàlisi de regressió s'ha realitzat d'acord amb el mètode de Hosmer and Lemeshow (1989) amb SAS 8.2 (SAS Istitute, Cary, North Carolina). Bàsicament, aquest mètode es compon de cinc punts: anàlisi de totes les variables per associacions univariants; construcció d'un model complet utilitzant totes les variables que s'han verificat com a significatives per les associacions univariants; eliminació pas a pas de les variables no significatives del model complet i comparació del model reduït amb el model anterior per establir l'ajustament del model i els possibles factors de confusió; eliminació; avaluació de les interaccions plausibles entre variables i confirmació de l'ajustament del model utilitzant els mètodes estadístics de Hosmer-Lameshow. Les variables amb associacions univariants que mostraven valors de $P < 0.25$ es van incloure en el model. Es va continuar modelant fins que els principals efectes o interaccions van ser significatius d'acord amb el mètode estadístic de Wald per a una $P < 0.05$.

Els percentatges d'animals seropositius durant els primer, segon, tercer i quart any de mostreig s'han comparat a cada parròquia amb el Test de Chi Quadrat.

RESULTATS.

L'anàlisi de les dades obtingudes es divideix en dos apartats: a) anàlisi total a nivell del Principat de les dades analitzades i factors de risc associats mitjançant un model de regressió logística i b) anàlisis per Parròquies de les dades, ja que cada Parròquia gestiona la pastura dels seus ramats de manera independent.

Dades serològiques a nivell del Principat

Durant aquests cinc anys de mostrejos (2001-2005) s'han obtingut un total de 1.758 sèrums d'animals, que pertanyen a 26 explotacions. Del total de 1.758 sèrums analitzats 130 mostres van ser positives, amb una seroprevalença mitjana del 7,4%. De les 26 explotacions, 22 han presentat com a mínim un animal seropositiu. Observant una seroprevalença de granges afectades del 84,6%.

Les dades obtingudes sobre les variables estudiades com a factors que afecten l'incidència de la seropositivitat a *N. caninum* per anàlisi de regressió es presenten a la Taula 4.

Variable Dependent		N	Risc relatiu (odds Ratio)	Nivell de Confiança del 95%	Valor de P
Edat	<4 anys	844			
	≥ 4 anys	914	1.64	1.10-2.45	0.016
Parròquia					0.02
	Parròquia 3		2.10	1.14-3.85	0.018
Raça					0.04
	Raça L+XL		0.15	0.03-0.61	0.008

Taula 4. Anàlisi multi-variant de regressió logística indicant les variables incloses en el model final de factors que afecten la seroprevalença de *N. caninum* al Principat d'Andorra.

Likelihood ratio test = 861.6; 14 d.f., P = 0.0001.

Hosmer and Lemeshow goodness of fit statistics = 7.08, 8 d.f., P = 0.53 (el model encaixa).

Parròquia 3: Ordino considerant Encamp com a referència.

Raça L+XL. Limousin i creuaments considerant com a referència raça Bruna i creuaments.

*Factors que afecten la seroprevalença de *N. caninum* a Andorra*

Els principals factors que afecten de manera clara la seroprevalença individual als bovins del Principat d'Andorra són: l'edat de l'animal, la Parròquia a què pertanyen i la raça.

Edat

La distribució per edats se mostra a a la taula 5. És important destacar que a Andorra hi ha algunes explotacions que tenen animals d'edats molt avançades (superiors als 15 anys) en producció. Un total de 44 animals mostrejats tenien una edat superior als 15 anys.

Edat (anys)	Animals analitzats	Animals positius	Prevalença (%)
0	39	1	2,6
1	70	3	4,3
2	216	9	4,2
3	263	19	7,2
4	256	12	4,7
5	194	18	9,3
6	159	9	5,7
7	130	12	9,2
8	97	13	13,4
9	83	16	19,3
10	57	4	7,0
11	44	5	11,4
12	48	4	8,3
13	28	0	0
14	30	3	10
15	23	2	8,7
16	11	0	0
17	4	0	0
18	1	0	0
19	3	0	0
20	1	0	0
21	1	0	0

Taula 5. Animals de cada edat mostrejats a Andorra i presència d'Ac enfront a *N. Caninum*.

La distribució de prevalences per edats mostra que les prevalences més elevades es varen observar en els animals de 8 i 9 anys. Arribant a tenir un valor màxim del 19,3 % en els animals de 9 anys (Taula 5).

Per l'anàlisi estadístic, les mostres es varen separar en dos grups d'edat:

- Animals menors de 4 anys d'edat: vedelles de reposició a partir de 6 mesos d'edat fins a vaques de primer part. Braus menors de 4 anys.
- Animals de més de 4 anys d'edat: Vaques múltiples i braus de més de 4 anys d'edat.

El disseny d'aquests dos grups ha tingut en compte la situació de maneig dels ramats al Principat, on les vedelles de reposició romanen en estabulació o bé pasturen en pastures molt aïllades i controlades, sempre sense mascles. Els animals (mascles i femelles) majors de 4 anys, tenen zones de pastura molt més amples i accessibles (estacions d'esquí, parcs naturals, prats de dall, etc.) on s'hi concentra i relaciona fauna diversa ja sigui domèstica o salvatge. L'objectiu d'aquesta pràctica és el d'evitar parts no desitjats en vedelles de reposició massa joves. Un objectiu òptim de producció i reproducció en races càrnies en extensiu és el d'aconseguir el primer part als 3 anys de vida.

En l'anàlisi de regressió es va observar que els animals majors de 4 anys de vida (prevalença del 9,4%, Taula 6), tenen 1,64 cops més possibilitats de ser seropositius que el grup d'animals joves (prevalença del 5,2%, Taula 6) ($P < 0,01$).

Grup d'edat	Animals analitzats	Animals positius	Prevalença (%)
<4 anys	844	44	5,2
≥4 anys	914	86	9,4

Taula 6. Distribució de la prevalença d'anticossos enfront *N. caninum* per grups d'edat.

Parròquia

Es van observar diferències estadísticament significatives entre les diferents parròquies o zones de pastura. Basant-nos en l'odds ratio, la prevalença d'infecció dels animals que pasturen a Ordino- Parròquia 3- (prevalença 8,5%) ha estat 2,10 cops més alta ($P < 0.01$) que els animals que pasturen a Encamp-Parròquia 2- (prevalença 6,6%) (Taula 7), presa com a referència. Tot i que a les parròquies de La Massana i Sant Julià presenten seroprevalences més altes, no va ser possible obtenir un nombre de mostres elevat, fet que determina que les diferències amb aquestes Parròquies no influeixin en l'anàlisi de regressió.

Parròquia	Animals analitzats	Animals positius	Prevalença (%)
Canillo	798	54	6,8
Encamp	648	43	6,6
Ordino	213	18	8,5
La Massana	84	12	14,3
Sant Julia	15	3	20,0

Taula 7. Distribució de la prevalença d'anticossos enfront *N. caninum* per parròquia.

Raça

A la majoria d'explotacions del Principat és normal trobar diferents races i els seus creuaments dins d'una mateixa explotació. Hi ha poques explotacions que presentin ramats homogenis pel que fa a una raça pura determinada. Tot i aquesta heterogenia de races i els seus creuaments dins una mateixa explotació, aquesta tendència també va disminuint i, previsiblement, ho farà encara més degut al seguiment majoritari entre els ramaders, del Programa de Millora Genètica de la raça Bruna d'Andorra, que potencia i afavoreix la cria i reposició d'animals d'aquesta raça.

Per facilitar l'anàlisi estadístic i unificar dades s'ha optat per la formació dels següents grups de races: Raça pura + els seus creuaments. Tenint en compte que un animal creuat, se li adjudica el creuament de la raça que presenta la mare. Exemple: un

animal creuat de bruna d'Andorra (XBR), la seva mare és de raça bruna d'Andorra i el pare d'una altra raça.

Els animals mostrejats en aquest estudi pertanyen a les següents races i els seus creuaments: bruna (BR+XBR), llemosina (L+XL), charolais (X +XX), aubrachs (AU), gascona (G+ XG), blonde d'Aquitànie (BA+ XBA), deutsche fleckvieh (DF+ XDF), deutsche braunvieh (DB), frisó (XF) i montbeliarde (XM).

S'ha observat que els animals de raça llemosina i els seus creuaments presenten unes seroprevalències (1,3 %), 6,7 vegades (1/0,15) més baixes que la resta de les races i els seus creuaments si prenem la raça bruna d'Andorra com a referència ($P < 0,002$) (Taula 8).

La raça llemosina estava present en 16 dels 26 ramats estudiats i en totes les parròquies, excepte a St. Julià, on només es varen mostrejar 15 caps de raça bruna d'Andorra. El nombre d'animals de raça llemosina va variar entre 1 i 42 animals per explotació i mai es va analitzar un ramat que fos només de raça llemosina. Només 2 animals de raça llemosina de 155 mostrejats varen ser seropositius (Taula 8).

Raça	Animals analitzats	Animals positius	Prevalença (%)
AU	74	1	1,4
BA+ XBA	48	0	0
BR+XBR	905	82	9,1
DF+XDF	45	0	0
G+XG	115	3	2,6
L+XL	155	2	1,3
X+XX	392	41	10,5
DB	8	1	12,5
XF	13	0	0
XM	3	0	0

Taula 8. Distribució de la prevalença d'anticossos enfront *N. caninum* per races.

*Factors que no afecten la seroprevalença de *N. caninum* a Andorra*

Any de mostreig

S'han considerat els 5 anys en què s'han obtingut mostres serològiques per analitzar la presència de *N. caninum* tot i que l'any 2005 el nombre de mostres analitzades va ser baix (Taula 10). No s'ha trobat una diferència estadísticament significativa entre els nivells de seroprevalença en els diferents anys de mostrejos, variant del 5,9% al 13,7% segons els anys (Taula 9).

S'observa que només l'any 2005 s'ha superat una seroprevalença superior al 10% (13,7%). En els mostrejos de 2005 es van mostrejar un nombre reduït d'animals que incloïa un ramat no sotmès a estudi els anys anteriors i no integrat dins el projecte d'eradicació que presentava problemàtica d'avortaments i posteriorment també es va observar una prevalença inicial a *N. caninum* elevada.

Any de mostreig	Animals analitzats	Animals positius	Prevalença (%)
2001	197	15	7,6
2002	461	27	5,9
2003	500	32	6,4
2004	549	49	8,9
2005	51	7	13,7

Taula 9. Seroprevalença de infecció enfront *N. caninum* en bovins de carn d'Andorra segons any d'estudi.

Sexe

La majoria de les mostres estudiades pertanyen a femelles (1.700 animals) i s'han analitzat 58 mostres que pertanyen a mascles reproductors, de les quals només una ha estat amb resultat positiu (Taula 10). No hi ha diferències estadísticament significatives entre sexes, enfront a la seropositivitat a *N. caninum*.

Sexe	Animals analitzats	Animals positius	Prevalença (%)
Femelles	1700	129	7,6
Mascles	58	1	1,7

Taula 10. Seroprevalença d'infecció enfront *N. caninum* en bovins de carn d'Andorra segons el sexe.

País d'origen

Els animals que han estat mostrejats en aquest estudi presentaven 5 orígens o nacionalitats diferents: Andorra (AD), Espanya (ES), França (FR), Alemanya (DE) i Àustria (AUT). Els animals d'origen alemany i austriac són animals d'edats avançades que varen entrar a Andorra entre els anys 1985 i 1993. Les entrades d'animals provinents d'Espanya i França han estat i són més constants i nombroses. Tot i això, la tendència d'adquirir animals no andorrans és a la baixa degut a la instauració del Programa de Millora Genètica de la raça Bruna d'Andorra (a partir any 2000).

Nacionalitat	Animals analitzats	Animals positius	Prevalença (%)
Andorra	964	65	6,7
Àustria	9	0	0
Alemanya	36	3	8,3
Espanya	522	51	9,8
França	227	11	4,8

Taula 11. Seroprevalença d'infecció enfront *N. caninum* en bovins de carn d'Andorra segons l'origen.

No s'han observat diferències estadísticament significatives que puguin relacionar l'origen d'un animal i la seroprevalença enfront de *N. caninum* a Andorra.

Propietari-explotació

Les seroprevalències intra-granja enfront *N. caninum* que s'han observat oscil·len entre un valor mínim del 0% i un valor màxim del 25,0% (Taula 12). De les 26 explotacions estudiades, només 4 no han presentat cap animal seropositiu, encara que en una d'elles només es van mostrear dos animals (explotació 4).

Explotació (Codi)	Parròquia	Animals analitzats	Animals positius	Prevalença (%)
101	Canillo	5	1	20,0
102	Canillo	21	2	14,3
103	Canillo	26	0	0,0
104	Canillo	50	4	8,0
105	Canillo	123	6	4,9
106	Canillo	53	3	5,7
107	Canillo	177	14	7,9
108	Canillo	49	6	12,2
109	Canillo	106	11	10,4
111	Canillo	81	5	6,2
140	Canillo	104	1	1,0
4	Canillo	2	0	0,0
201	Encamp	70	11	15,7
202	Encamp	208	19	9,1
203	Encamp	134	3	2,2
204	Encamp	126	3	2,4
205	Encamp	3	0	0,0
206	Encamp	34	0	0,0
207	Encamp	72	7	9,7
306	Ordino	38	3	7,9
308	Ordino	120	4	3,3
311	Ordino	54	10	18,5
402	La Massana	45	6	13,3
403	La Massana	42	7	16,7
607	Sant Julia	8	2	25,0
608	Sant Julia	7	1	14,3

Taula 12. Seroprevalença d'infecció enfront *N. caninum* en bovins de carn d'Andorra segons l'explotació.

Analitzant estadísticament totes les explotacions mostrejades, no podem concloure que hi hagi cap diferència significativa pel què fa a la prevalença de *N. caninum* de les diferents explotacions.

Efecte de la repetició de mostrejos

La repetició de mostreig en els animals també es va incloure en el model estadístic i no va tenir significança en els resultats (Taula 13). Del total de mostres analitzades, 399 van ser mostrejades en una sola ocasió i 1.359 en dos o més mostrejos.

Efecte de repetició de mostreig	Mostres analitzades	Mostres positives	Prevalença (%)
1 mostreig	399	30	7,5
Dos o més mostretjos	1359	100	7,4

Taula 13. Seroprevalença d'infecció enfront *N. caninum* en bovins de carn d'Andorra segons el nombre de mostretjos a que s'han sotmès.

Durant els 4 anys d'aquest estudi, un total de 376 animals han estat mostrejats, com a mínim, dues vegades.

Analitzant l'estat serològic d'aquests animals, s'ha observat que un 89,6% dels animals mostrejats diferents vegades mantenen l'estat serològic inicial. Un total del 87,2% (328 animals) s'havien mantingut com animals seronegatius en tots els mostrejos, mentre que un 2,4% (9 animals) havien estat positius en tots els seus mostrejos.

Un 10,4% (39 animals) dels 376 animals analitzats com a mínim dues vegades varen presentar resultats variables: 22 d'aquests animals havien estat seronegatius en els mostrejos inicials i varen seroconvertir en anàlisis posteriors (5,9% del total d'animals analitzats en, almenys, dos mostrejos). Quan hem analitzat a partir de quin any s'esdevenen aquestes seroconversions, s'ha apreciat que la majoria (14 de 22 animals) ho va fer entre el mostreig de 2002 i el de 2003.

La resta d'animals que varen presentar canvis en el seu estat serològic (17 animals), presentaven fluctuacions en els nivells de seropositivitat-seronegativitat en algun dels anys en que s'havia repetit el mostreig.

Dades serològiques en gossos

En aquest estudi s'han analitzat un total de 8 gossos d'atura (5 Border Collie i 3 Pastor Alemany) i un Golden Retriever pertanyents a 5 de les explotacions analitzades. S'han trobat 3 animals seropositius (33,3% de seroprevalença). Dos dels gossos seropositius pertanyen al mateix ramat, essent aquest ramat un dels que va mostrar prevalences més elevades d'infecció en els bovins (18,5% de un total de 54 vaques analitzades).

Estudi dels fetus avortats i la relació de desordres reproductius amb les vaques avortades.

Durant la realització d'aquest estudi, s'ha pogut obtenir mostres de 13 avortaments patits per vaques adultes del Principat d'Andorra. Aquesta tasca ha estat difícil degut al règim semi-extensiu del sistema de producció que es practica a Andorra. El fet que els animals pasturin en territoris extensos, no sempre de fàcil accés i a alta muntanya a comportat les següents dificultats: quan s'ha trobat un avortament a les zones de pastura no sempre s'ha pogut identificar i mostrejar la vaca que havia patit l'avortament, aquestes zones de pastura són compartides amb animals d'altres espècies (salvatges i domèstiques) entre els quals hi ha carronyaires i l'estat dels fetus i restes de l'avortament sovint presentaven estats d'autòlisi avançats.

Els fetus avortats presentaven edats de gestació d'entre 4,5 a 8,5 mesos.

Amb les dades productives i reproductives que s'ha pogut obtenir d'algunes de les explotacions del Principat els índexs reproductius que s'han obtingut són els següents (índex objectiu entre parèntesi):

- Interval entre parts: 380 dies (365 d).
- Durada de la gestació 293 dies (<290 dies)
- % animals eliminats per causes reproductives: <1% (<5%)
- Edat al primer part: 35 mesos (30-36 mesos).

Tot i les dificultats esmentades anteriorment, es van mostrejar tots els fetus i restes d'avortament que es varen trobar per intentar-ne el diagnòstic histopatològic i de PCR. Depenent de l'estat dels teixits s'ha pogut realitzar totes les proves diagnòstiques o no (Taula 14).

Vaca avortada	Parròquia	Serologia vaca	Òrgan analitzat	Resultat PCR	Lesions histològiques compatibles amb <i>N. caninum</i>	Resultat IHC
AD2237	Encamp	+	SNC	+	-	-
P1	Encamp	?	SNC	+	NA	NA
ES 8557	Encamp	-	SNC	-	-	-
AD 0034	Canillo	-	SNC	-	-	-
P3	Canillo	?	SNC	+	NA	NA
P4	Canillo	?	SNC	-	NA	NA
AD 1426	Ordino	?	SNC	+	NA	NA
AD 1026	Canillo	-	SNC	+	-	-
P2	Ordino	?	SNC	-	NA	NA
AD 0542	Ordino	+	SNC	+	NA	NA
AD 0447	Ordino	-	SNC	-	-	-
AD 1042	Ordino	-	SNC	-	+	-
			PULMÓ	-	-	-
			FETGE	-	+	-
			PLACENTA	-	NECROSI	-
			COR	-	DUBTÓS	-
AD 3579	La Massana	+	SNC	+	+	+
			FETGE		+	+
			COR		+	+

Taula 14. Resultat dels fetus i restes d'avortaments.

?: mare desconeguda o sense resultats de serologia en el moment del mostreig.

NA: Mostres no analitzades mitjançant histopatologia. L'estat dels teixits era molt autolític i només es va extreure DNA del cervell per anàlisi de PCR.

Els animals P1, P2, P3, P4 són fetus de mares no-identificades, ja que aquests fetus es van trobar als prats de pastura.

Dels 13 fetus analitzats, 8 varen resultar ser positius a PCR per *N. caninum* (61,53% dels fetus analitzats van ser positius). Degut a l'estat d'autòlisi de molts dels fetus en el moment del mostreig, només en 7 casos es varen poder realitzar anàlisis histopatològics. En 2 d'aquests 7 fetus (28,6% dels analitzats histopatològicament) es varen observar lesions d'inflamacions multifocals de tipus no-supuratiu compatibles amb *Neospora*. Tot i que només en un d'ells es va poder confirmar la presència del paràsit mitjançant IHC específica enfront a *Neospora*. Cal destacar que l'altre fetus amb lesions compatibles a una infecció per *Neospora*, l'estava gestant una mare seronegativa, va donar negatiu a PCR i també a IHC específica enfront a *N. caninum*, fet que suggereix que les lesions observades no eren degudes al paràsit.

Tots els fetus provinents de vaques que es varen poder identificar immediatament després a l'avortament i varen resultar seropositives enfront *N. caninum* en el moment de l'avortament (3 animals), van donar resultat positiu al ser sotmesos a PCR. En el cas de 4 mares seronegatives en el moment de l'avortament, els seus fetus varen donar resultat negatiu a proves de PCR o IHC (entre aquests, hi trobem el fetus esmentat anteriorment amb lesions compatibles però molt probablement no degudes al paràsit). El cas concret de l'animal AD1026, és especialment interessant, ja que la mare va resultar seronegativa en el moment de l'avortament però el fetus va ser PCR positiu.

Degut a la manca de sistemes de monitorització i gestió de dades reproductives de les explotacions, no hi ha registre de gestacions anteriors de les vaques en producció ni registre de possibles problemes reproductius i/o obstètrics que hagin pogut patir. Les poques dades que s'han pogut obtenir mitjançant preguntes directes al ramader.

Amb les dades que disposem, hem intentat fer el seguiment d'alguns animals avortats:

Per exemple, el vedell de la vaca ES8557, va néixer mort, però va ser negatiu a la PCR i la vaca sempre a presentat seronegativitat enfront a *N. caninum*, fet pel qual pensem que la neosporosi no va ser la causa d'aquest avortament.

L'animal ES4608 també va presentar seronegativita i en aquest cas, va expulsar un fetus momificat que no va poder ser analitzat.

Com ja s'ha referenciat anteriorment, en el cas del fetus de la vaca AD1026, les anàlisis serològiques van ser negatives però el fetus va presentar parasitació a nivell de cervell (PCR positiu).

Tot i que no es varen poder analitzar els fetus avortats, també és d'interès observar que l'animal AD2246, va tenir la seva 1^a cria als 6 anys d'edat, i ha estat seropositiu en tots els mostrejos serològics a què ha estat sotmès. També hi va haver 2 animals seropositius de la mateixa explotació que, segons el ramader, varen patir avortaments, però no en varem poder mostrejar els fetus. Un altre animal seropositiu de l'explotació va presentar un interval part-concepció de 430 dies. Podria ser que els problemes reproductius d'aquestes vaques estiguessin relacionats amb la parasitació.

En el cas de la vaca AD2237, de la qual se'n va poder recollir el fetus avortat, va ser seronegativa en un mostreig anterior realitzat només 2 mesos abans de l'avortament, però va ser clarament seropositiva el dia de l'avortament; indicant que el contacte amb el paràsit es va produir entre les dues extraccions de sang realitzades. En un mostreig posterior a l'avortament, es va poder observar que la vaca continuava essent seropositiva. Els braus de l'explotació (2 animals) a la que pertanyia aquesta vaca van ser negatius, així com també l'analítica de les dues gosses d'atura de l'explotació (raça Border Collie). En aquest cas, el fetus presentava mal estat, amb teixits molt autolítics; és per això que només es va recollir el SNC per obtenció de DNA que va ser possible i va resultar positiva.

Dades serològiques a nivell de parròquies

Canillo

Han estat analitzades un total de 798 mostres i d'aquestes 54 amb resultat positiu, indicant una prevalença del 6,8%.

Quan s'han analitzat els factors que van afectar la seroprevalença en aquesta parròquia, tal i com ha passat amb els resultats a nivell de tot el país, es va observar l'efecte de l'edat dels animals i la raça.

Estudiant les dades obtingudes dels mostrejos a Canillo, observem que els animals majors de 4 anys presentaven prevalences significativament més elevades que els d'edats menor (8,9 % versus 4,4%, respectivament) (Taula 15) (P=0,011).

Grup d'edat	Animals analitzats	Animales positius	Prevalença (%)
<4 anys	384	17	4,4
≥4 anys	414	37	8,9

Taula 15. Distribució de la prevalença d'anticossos enfront *N. caninum* per grups d'edat. Parròquia de Canillo.

A l'estudi d'aquesta parròquia s'han mostrejat animals de 5 races i els seus creuaments: BA+XBA, BR+XBR, G+XG, L+XL y X+XX i es van observar diferències estadísticament significatives entre las races (P=0,001) (Taula 16).

Raça	Animals analitzats	Animals positius	Prevalença (%)
BA+ XBA	47	0	0
BR+XBR	410	22	5,4
G+XG	14	0	0
L+XL	42	0	0
X+XX	285	32	11,2

Taula 16. Distribució de la prevalença d'anticossos enfront *N. caninum* per races. Parròquia de Canillo.

Mitjançant anàlisi d'ANOVA es va determinar que les races X-XX i BR-XBR són les que presentaven les prevalences més elevades i amb diferències estadísticament significatives respecte la resta de races de la parròquia. No es varen trobar diferències estadísticament significatives entre les races X-XX i BR-XBR.

No hi va haver diferències estadísticament significatives amb l'any de mostreig. La seroprevalença va ser del 6,1% l'any 2001 (115 mostres), del 4,8% el 2002 (207 mostres), 6,6% el 2003 (242 mostres) i del 9,8% el 2004 (174 mostres analitzades). L'any 2005 només es varen analitzar 10 mostres que no han estat incloses a l'anàlisi estadística.

Tampoc es van observar diferències entre sexes dels animals analitzats. 28 mostres de mascle (0 % positius) i 770 femelles (7% de positius).

No s'han observat diferències estadísticament significatives entre els diferents orígens dels animals mostrejats. Els animals mostrejats en aquesta parròquia provenien de 4 nacionalitats diferents: Andorra (AD) (34 animals seropositius de 432 mostrejats, prevalença del 7,9%), Espanya (ES) (15 animals seropositius de 263 analitzats, prevalença del 5,7%), França (FR) (5 animals seropositius de 37 analitzats, prevalença del 13,5%) i Alemanya (DE) (0 animals positius de 12 analitzats).

Tampoc es van observar diferències estadísticament significatives entre les diferents explotacions però sí que indica certa tendència cap a la significança ($P=0,086$). S'han mostregat 11 explotacions que presenten tamanyos d'entre 2 i 177 caps amb una seroprevalença mitjana intra-granja del 6,8% (min 0%- màx 20,0%). Una explotació no ha presentat cap seropositiu durant l'estudi (AD103) (Taula 12).

Encamp

En aquesta parròquia han estat analitzades un total de 648 mostres, 43 de les quals han estat positives (prevalença= 6,6%).

Els factors que van afectar la seroprevalença a Encamp van ser: l'edat dels animals i la raça, seguint la tendència de l'anàlisi dels resultats a nivell de tot el Principat. També es van observar diferències estadísticament significatives entre l'origen dels animals i les explotacions.

Com a Canillo, els animals de la parròquia d'Encamp majors de 4 anys d'edat presentaven una prevalença estadísticament major (prevalença= 9,2%) que els animals de menys de 4 anys d'edat (prevalencia=4,0%) (P=0,006) (Taula 17).

Grup d'edat	Animals analitzats	Animals positius	Prevalença (%)
<4 anys	322	13	4,0
≥4 anys	326	30	9,2

Taula 17. Prevalences enfront *N.caninum* segons grups d'edat a la Parròquia d'Encamp.

Les prevalences van mostrar diferències entre les races analitzades (P= 0,003). L'anàlisi d'ANOVA indica diferències estadísticament significatives entre la prevalença de la raça BR-XBR (prevalença= 11,1%) i els animals de raça L+XL (prevalença= 0,9%) (Taula 18).

Raça	Animals analitzats	Animals positius	Prevalença (%)
BR+XBR	287	32	11,1
DB	3	0	0
DF+XDF	44	0	0
G+XG	99	3	3,0
L+XL	108	1	0,9
X+XX	95	7	7,4
XF	9	0	0

Taula 18. Distribució de la prevalença d'anticossos enfront *N. caninum* per races. Parròquia d' Encamp.

A Encamp es van mostrejar un total de 7 explotacions, amb valors de prevalença que van de 0% a 15,7%. Dos explotacions no van a presentar animals seropositius (AD205 i AD206). El cens de les explotacions oscil.lava entre 3 i 208 animals.

Es van trobar diferències estadísticament significatives entre les diferents explotacions de la parròquia ($P=0.000$). La prevalença d'anticossos a l'explotació AD201 (prevalença=15,7%) va ser significativament major que la prevalença observada a les explotacions AD203 (prevalença= 2,2%), AD204 (prevalença= 2,4%) i AD206 (prevalença= 0,0%).

En quant a l'origen dels animals d'Encamp, existeixen diferències significatives entre l'origen de los animals ($P= 0,001$). Segons els resultats de l'anàlisi d'ANOVA, els animals d'origen espanyol (prevalença=15,2%), van mostrar una prevalença significativament més elevada que els animals nascuts a Andorra (prevalença= 3,1%), França (prevalença= 2,6%) i Àustria (prevalença= 0,0%), no es van observar diferències amb els animals d'origen alemany (Taula 19).

Nacionalitat	Animals analitzats	Animals positius	Prevalença (%)
Andorra	320	10	3,1
Àustria	9	0	0
Alemanya	19	2	10,5
Espanya	184	28	15,2
França	116	3	2,6

Taula 19. Distribució de la prevalença d'anticossos enfront *N. caninum* segons país d'origen. Parròquia d' Encamp.

No s'observen diferències estadísticament significatives segons l'any de mostreig. Un 10,7% (8 mostres positives de 75 analitzades) el 2001; 5,9% (11 positives de 186 analitzades) el 2002; 5,7% (11 positives de 193 analitzades) el 2003 i 6,2% (12 positives de 193 analitzades) el 2004. L'any 2005 només es va analitzar una mostra procedent d'aquesta parròquia que no es va incloure a l'anàlisi estadístic.

Tampoc es varen observar diferències estadísticament significatives entre sexes. Es van analitzar un total de 22 mostres pertanyents a mascles (tots negatius) i 626 femelles, 43 de les quals presentaven anticossos en sang (prevalença= 6,8%).

Ordino

S'han analitzat 213 mostres, obtenint 18 mostres positives, amb una prevalença mitjana del 8,4%.

A Ordino, a diferència de Canillo i Encamp, no es van observar diferències estadísticament significatives de les seroprevalències per grups d'edat ($P= 0,53$), amb prevalències del 8,8% (8 positius de 91) en animals menors de 4 anys, i del 8,2% (10 positius de 122) en animals majors o iguals a 4 anys d'edat.

Els animals analitzats pertanyien a les següents races (Taula 20):

Raça	Animals analitzats	Animals positius	Prevalença (%)
AU	74	1	1,3
BA+XBA*	1	0	0
BR+XBR	121	17	14,0
DF+XDF*	1	0	0
L+XL	4	0	0
X+XX	8	0	0
XF	4	0	0

Taula 20. Distribució de la prevalença d'anticossos enfront *N. caninum* per races. Parròquia d' Ordino.

Dues de les races analitzades només presentaven 3 animals mostrejats (BA+XBA i DF+XDF), aquestes dues races es varen excloure de l'anàlisi estadístic. Analitzant estadísticament la resta de races s'observen diferències estadísticament significatives ($P=0,025$) entre la raça BR+XBR (prevalença= 14,0%) i AU (prevalença= 1,3%).

De les 3 explotacions estudiades a Ordino (Taula 12), es van observar diferències estadísticament significatives ($P= 0,003$) entre les explotacions AD311 (8,5%, 10 positius de 54) i AD 308 (3,3%, 4 positius de 120).

No es va observar cap efecte del sexe (6 mascles i 18 vaques seropositives de 207 mostres analitzades), ni l'any de mostreig (6 animals seropositius de 58 el 2002, 5 seropositius de 49 el 2003, 5 seropositius de 66 el 2004 i 2 seropositius de 40 el 2005, però sí que s'observa tendència a la significança estadística ($P= 0,12$) respecte el factor origen, trobem animals d'origen andorrà (13 positius de 123, prevalença= 10,69), animals d'origen espanyol (4 positius de 35, prevalença= 11,4%) i els animals d'origen francès presentaven una seoprevalença de 1,8% (1 positiu de 55). Novament els animals nascuts a França varen ser els que presentaven seroprevalences d'infecció menors.

La Massana

El número de mostres analitzat a La Massana ha estat limitat. S'han analitzat 84 mostres, 12 de les quals són seropositives (prevalença= 14,3%). Totes les mostres pertanyen a dues explotacions (Taula 12) analitzades l'any 2004.

És possible que, degut al nombre reduït de mostres analitzades, no s'apreciï la influència de cap de les variables independents sotmeses a estudi. Només s'ha observat certa tendència a la significança quan comparem els resultats entre races ($P = 0,079$). Les mostres analitzades en aquesta parròquia pertanyen a les següents races (Taula 21).

Raça	Animals analitzats	Animals positius	Prevalença (%)
BR+XBR	72	8	11,1
DB	5	1	20,0
G+XG	2	0	0
L+XL	1	0	0
X+XX	4	2	50,0

Taula 21. Distribució de la prevalença d'anticossos enfront *N. caninum* per races. Parròquia de la Massana.

Com s'ha fet anteriorment, ja que dues de les races presentaven menys de 3 animals mostrejats (G+XG i L+XL), han estat eliminades de l'anàlisi estadístic. Amb la resta de races, l'anàlisi estadístic va indicar la tendència a la significança que hem esmentat més amunt.

És important destacar que l'única mostra seropositiva de l'estudi d'un mascle reproductor pertany a aquesta parròquia (1 brau seropositiu de 2 mascles analitzats).

Sant Julià

A la Parròquia de St Julià, només es van analitzar 15 mostres l'any 2004, de les quals 3 eren seropositives (prevalença= 20%). Tots els animals seropositius eren de raça BR+XBR i nascuts a Andorra. Degut al baix nombre de mostres no s'ha realitzat cap anàlisi estadístic intra-parròquia.

DISCUSSIÓ GENERAL.

L'estudi de la neosporosi a Andorra ha presentat una elevada seroprevalença de granges afectades pel paràsit, ja que prop del 85% de les 26 explotacions estudiades han presentat com a mínim un animal seropositiu. A Canadà i nord-oest d'Estats Units s'hi presenten situacions similars, ja que gairebé el 100% de les explotacions de boví de carn estan exposades a *N. caninum* (Waldner et al., 1998; Sanderson et al., 2000). A Uruguay, un estudi recent sobre 229 explotacions ha obtingut una seroprevalença una mica menor del 69,2% (Banales et al., 2006). Estudis previs realitzats a Espanya sobre *N. caninum* en boví d'aptitud càrnia (Quintanilla-Gozalo et al., 1999) obtenia una taxa d'infecció dels 55,1% dels ramats estudiats. Més recentment, s'han observat taxes d'infecció als ramats d'un 46% de 372 explotacions a Espanya similars a les d'Alemanya (41% de 106 explotacions). A Holanda s'ha obtingut una prevalença del 61% a Holanda (82 explotacions) (Bartels et al., 2006).

A més de ser una infecció extesa, el fet de no trobar diferències estadísticament significatives entre els nivells de seroprevalença en els diferents anys de mostrejos ens indica que la situació de la neosporosi al Principat és endèmica.

Tot i que gairebé totes les explotacions estan afectades, la prevalença individual d'infecció en els ramats analitzats de maneig extensiu va ser relativament baixa, del 7,4% en comparació amb l'estudi realitzat a Espanya sobre ramats de carn, en el qual la taxa de prevalença individual va ser d'un 17,9% (Quintanilla-Gozalo et al., 1999) i del 15,8% (Bartels et al., 2006), mentre la taxa de prevalença individual va ser de un 35,9% en boví de llet respectivament (Quintanilla-Gozalo et al., 1999). Un estudi anterior realitzat a Andorra, en una explotació concreta on es va demostrar un avortament causat per *N. caninum* (Armengol et al., 2006) la seroprevalença dels animals també va ser baixa (prevalença = 9,2%). Els valors baixos de seroprevalença al Principat d'Andorra podrien ser deguts al maneig extensiu dels animals. En els sistemes de producció extensius, la probabilitat de contacte amb ooquistes seria menor comparat amb sistemes de producció de boví de carn en intensiu o bé en boví de llet, sistemes on el sistema de pastura és poc freqüent o nul. A més, en els sistemes intensius, la taxa de reposició és més elevada, fet que incrementa el risc de transmissió vertical.

Neospora caninum afecta tan a bovins d'aptitud lletera com d'aptitud càrnia (Hoar et al., 1996; Waldner et al., 1998; 1999). Tot i això, si comparem els estudis realitzats en boví de carn amb els realitzats en boví de llet, en general podem observar prevalences més baixes en els ramats de boví de carn (Quintanilla-Gozalo et al., 1999; Venturini et al., 1999; De Merschman et al., 2000; Moore et al., 2002, Koiwai et al., 2005; Bartels et al., 2006). Aquestes diferències entre boví de llet i de carn no semblen ser degudes a l'aptitud dels animals sinó que, como s'ha indicat poden ser degudes principalment al maneig de cadascun d'aquests sistemes de producció. Tot i això, s'han evidenciat diferències en l'extensió i severitat de les lesions observades en fetus infectats amb *Neospora caninum* en bovins de diferent aptitud, amb lesions més greus i evidents en el boví de llet (De Meerschman et al., 2002), fet que sembla indicar possibles diferències més profundes en la tendència de la infecció i dels seus efectes.

Cal remarcar que les prevalences varien molt segons els països o fins i tot regions on hi ha localitzats els diferents ramats. Aquesta observació, fa que a cada país o regió els factors de risc i l'impacte econòmic de la infecció per *Neospora* siguin diferents en els ramats (Caetano-da-silva et al., 2004). De fet, la seroprevalença del Principat és superior als resultats a Suècia en bovins d'aptitud lletera on la prevalença és de només un 2-7% (Björkman et al., 2000) i on a més s'ha observat que els avortaments deguts a *N. caninum* són inferiors a l'1% (Stenlund et al., 1999).

A l'anàlisi de regressió es va observar que a Andorra els animals majors de 4 anys de vida van tenir 1,64 cops més possibilitats de ser seropositius que el grup d'animals més joves. Aquest resultat, ens indica que la via d'infecció més important al Principat és la via horitzontal, ja que com més temporades en extensiu passa l'animal (a més avançada edat) a les zones de pastura, més probabilitats té de presentar seropositivitat. Si no hi hagués hagut diferències en les seroprevalences dels diferents grups d'edat, els resultats haguessin indicat que la via principal de transmissió de la parasitació per *N. caninum* dels bovins del Principat hauria estat la transmissió vertical. En les explotacions de boví lleter s'ha demostrat en diferents estudis que la via de transmissió vertical és la via més important de transmissió de *N. caninum* (Paré et al.,

1996; Schares et al., 1998; Davison et al., 1999; Stenlund et al., 1999; López-Gatius et al., 2004a). No obstant, igual com la situació observada a Andorra, la transmissió horitzontal sembla tenir major importància de la que inicialment hom podia pensar. La via de transmissió vertical permet mantenir la infecció dins el ramat durant varies generacions (Björkman et al., 1996; Wouda et al., 1998a) però no és efectiva en un 100%. Diferents estudis han demostrat l'elevada eficàcia de la via de transmissió vertical, però un 5-7% de la descendència de mares seropositives, pot ser seronegativa al naixement (Scharès et al., 1998; Davison et al., 1999), per tant, per tal que la infecció es mantingui indefinidament en un ramat s'hi hauria de donar fenòmens de transmissió horitzontal. La via de transmissió horitzontal també és responsable de l'aparició de brots d'avortaments deguts a *N. caninum* a les explotacions i és la responsable d'infectar explotacions indemnes a la malaltia i que practiquen l'auto-reposició (McAllister et al., 1996).

A més de les diferències d'edat en les prevalences establertes a Andorra, la prevalença que s'ha observat en els gossos de les explotacions sotmeses a estudi, tot i ser un nombre reduït de gossos analitzats, és una prevalença elevada i fa sospitar que la via més provable d'infecció en els bovins sigui el contacte amb ooquistes excretats per gossos de les explotacions, de les rodalies i també per cànids salvatges. Tot i que la guineu no ha estat confirmada com a HD, el fet que molt recentment s'hagin observat ooquistes en femtes de guineus al Canadà (Wapenaar et al., 2006), indicaria que cànids silvestres com la guineu roja podrien actuar com a HD, mantenint així un cicle selvàtic de la infecció (Almería et al., 2002). Donat que les guineus són els cànids silvestres més freqüents a la zona i degut al sistema de producció bovina del Principat (llargues estades dels bovins en semi-libertat) que facilita l'accés de guineus a despulles de parts o avortaments, podria provocar que aquests cànids silvestres siguin eliminadors d'ooquistes a Andorra.

El consum de fetus avortats, mornats, etc per part de guineus durant les èpoques de pastura en zones d'alta muntanya és habitual a la zona. Una altre possibilitat de contacte amb ooquistes pot ser degut als gossos de particulars que estan durant tot

l'any a les prades de pastura de les explotacions, els gossos dels turistes a l'estiu a l'alta muntanya i els gossos de mushing a les pistes d'esquí durant l'hivern. Cal recordar que moltes pistes d'esquí són zones de pastura a l'estiu.

Amb les condicions d'Andorra, la convivència estreta dels gossos amb els bovins afavoriria la transmissió horitzontal de la infecció. Per una part, el jaç i els aliments emmagatzemats (farratges i concentrat) contaminats amb ooquistes provinents de femtes de gossos infectats poden ser una font d'infecció pels bovins, i per altra banda, l'accés fàcil a placentes, fetus avortats i restes d'animals morts infectats, mantinguts als estables, seria la causa principal d'infecció a HD. Cal remarcar que en certes explotacions aquestes pràctiques són, fins i tot, incentivades pels ramaders seguint la creença que així s'estrengen els vincles entre gossos d'atura i bestiar. En aquest sentit, s'ha demostrat l'alta associació entre la presència de gossos a les explotacions lleteres i la infecció per *N. caninum* (Wouda et al., 1999). Aquests resultats s'han de prendre molt en compte pel que fa a les mesures de control i eradicació de la neosporosi al Principat d'Andorra.

Per corroborar la importància de la via horitzontal, l'estudi d'una de les vaques avortades i el seu fetus va indicar que amb tota probabilitat aquest tipus de transmissió va ser la causant de l'avortament. La vaca avortada havia resultat seronegativa a neosporosi dos mesos abans de patir l'avortament, durant un mostreig rutinari de tot el ramat, però va ser seropositiva el mateix dia que va patir l'avortament i seguia essent seropositiva en un mostreig posterior. Aquests resultats indicarien que l'animal no havia estat infectat per via vertical, ja que hauria estat positiu des del seu naixement, sinó que el contagi va ser via horitzontal, pel consum d'ooquistes en aliment o aigua contaminats. Tot i que s'han observat fluctuacions en els títols dels animals sotmesos a serologies, el fet que l'animal continués essent seropositiu en mostrejos posteriors i que hem observat una gran estabilitat dels mostrejos realitzats en tot el Principat, sembla indicar que l'animal no havia tingut contacte amb el paràsit quan es va realitzar el mostreig general del ramat dos mesos abans de l'avortament. A més, els mascles reproductors d'aquesta

explotació sempre varen ser seronegatius a la infecció i per tant la via seminal va quedar descartada en aquest cas en particular.

La via seminal com a transmissió horitzontal de *N. caninum* pot ser possible (Caetano-Silva et al 2004; Ferre et al., 2005) però és molt poc provable (Dubey et al., 2006, Serrano-Martinez et al., 2007). Tot i que el nombre de mascles sotmesos a estudi va ser reduït, el fet que les diferències no siguin significatives en funció del sexe ens indica la mateixa probabilitat de contagi, tan en mascles com femelles, ja que els mascles poden néixer de mares seropositives en igual proporció que les femelles.

La reduïda taxa de mascles infectats es pot explicar per raons de maneig: molts d'aquests mascles reproductors són comprats a França (país que fa anys té instaurat un programa d'eradicació de la neosporosi) i els mascles reproductors tenen una vida mitja de 5 anys, dels quals només es destinen com a reproductors els darrers 3 anys. En concret, en aquest estudi només un mascle va ser seropositiu. Aquestes dades i en aquest cas en concret, en la situació actual al Principat, la possibilitat d'una via seminal capaç d'infectar altres animals, no comporta preocupació, ja que l'únic mascle seropositiu es va sacrificar als 3 mesos d'haver estat analitzat com a positiu. El ramat i la vacada a que pertanyia aquest brau no han presentat valors de prevalença més alts que les altres parròquies.

A més de l'efecte de la edat i la via de transmissió horitzontal, un altre factor de risc ha estat la zona comunal de pastura. La Parròquia d'Ordino amb una prevalença del 8,5% ha estat 2,10 cops significativament més alta que els animals que pasturen a la Parròquia d'Encamp (prevalença= 6,6%), presa com a referència. El fet que els bovins de cada parròquia pasturen en zones comunals concretes i exclusives de cada parròquia durant els mesos d'estiu, ens confirma que les zones de pastura d'alta muntanya i les seves particularitats enfront les altres (diferents activitats de conservació de fauna salvatge, turístiques, cinegètiques, esportives i de treball) poden influir en la prevalença de la neosporosi dels bovins del Principat d'Andorra. Els cérvols rojos comparteixen àrees de muntanya amb els bovins d'Andorra. Els cérvols es consideren un dels principals reservoris de la infecció per *N. caninum* a Amèrica i també s'han observat anticossos en les espècies presents a la península ibèrica (Almería et al., 2007). Altrament,

la presència de guineus és important. El paper de les espècies silvestres en el cicle biològic del paràsit i la seva importància en relació amb la transmissió de la infecció no és del tot clar, però podria tenir implicacions importants en els nivells de prevalença d'infecció del paràsit en les explotacions de boví que pasturen en àrees compartides. Per tant, les mesures de control a les explotacions també han de considerar els animals salvatges.

Analitzant estadísticament totes les explotacions mostrejades, no es va observar cap diferència significativa pel que fa a la prevalença de *N. caninum* de les diferents explotacions. Això es podria explicar degut al sistema de gestió de la producció bovina al Principat, en la que el fet que un animal pertanyi a una explotació determinada perd importància, ja que a la pràctica, són animals que estan més temps en pastures comunes que no a la pròpia explotació i aquest factor sí que va ser significatiu en el model de regressió analitzat.

Un altre dels factors de risc de la infecció per *N. caninum* a Andorra ha estat la raça, que ha influït en els nivells de seroprevalença. S'ha observat que els animals de raça llimosina i els seus creuaments presenten unes seroprevalències (prevalença= 1,3%) 6,7 vegades més baixes que la resta de les races i els seus creuaments si prenem la raça Bruna d'Andorra com a referència. Ja que en 16 de les 26 explotacions mostrejades hi havia animals de raça llimosina i també animals d'altres races i creuaments, els resultats referents a la raça llimosina són representatius, i no són deguts a la possible presència d'animals llimosins en pocs ramats d'alguna parròquia de prevalença baixa.

Tot i que la majoria d'estudis no han trobat associació entre neosporosi i la raça (revisat per Caetano-da-Silva et al., 2004), a Suècia s'ha observat una associació significativa entre la infecció per *Neospora* i la raça Blanca i Vermella Sueca, i a Espanya amb les races més rústiques gallegues (Bartels et al., 2006). D'acord amb la observació de menys prevalença de neosporosi en els animals de raça llimosina a Andorra; resultats recents en boví d'aptitud lletera (raça Frisona), han observat que la inseminació de vaques seropositives amb semen de races càrnies, especialment de raça

llemosina, disminueix el risc d'avortament d'aquests animals (López-Gatiús et al., 2005b). Aquests resultats suggeririen que certes races, en concret la llemosina, són menys sensibles a la infecció per *N. caninum* que d'altres.

Quan es varen analitzar de manera separada, els factors de risc a les parròquies amb més mostrejors (Canillo i Encamp) varen ser els indicats en el model general de tot el Principat, amb l'edat i la raça com a principals factors de risc. També és interessant observar que a Encamp, una de les parròquies més mostrejades, a més d'aquests factors, també s'ha observat com a factor de risc l'origen dels animals; amb una prevalença major en els animals d'origen espanyol, fet que pot ser degut a la taxa de prevalença a Espanya i al fet que durant uns anys anteriors a l'estudi, molts animals de la cabana andorrana actual es varen comprar a Espanya. Actualment aquesta compra d'animals a Espanya és molt menor. Tot i que es varen trobar diferències estadísticament significatives entre les explotacions encampadanes, són degudes al maneig concret que es dona en una de les explotacions, i que té els prats de dall i les pastures de primavera i tardor just al centre de la població; fet important si tenim en compte que un gran nombre d'habitants passegen els seus gossos en aquests prats sense recollir-ne les defecacions.

A les parròquies menys mostrejades, com Ordino, a diferència de Canillo i Encamp, no es van observar diferències estadísticament significatives de les seroprevalències per grups d'edat, per tant, no podem concloure que a la parròquia d'Ordino la via de transmissió horitzontal fos la via més important de transmissió de la parasitació, però la menor quantitat de mostres analitzades podria haver emmascarat aquest efecte. Aquesta parròquia, com ja s'ha indicat, fou la que va presentar seroprevalències més altes, fet que seria explicable per un major efecte de la transmissió vertical del paràsit. No obstant, no varem poder estudiar les genealogies dels ramats degut a l'escassetat d'animals de diferents generacions en un mateix ramat, no podent demostrar aquesta sospita. També a Ordino, s'han observat diferències entre explotacions, que podrien ser explicades pel mateix motiu que les diferències observades a la parròquia d'Encamp.

En sintonia amb d'altres estudis publicats en boví lleter (Hasler et al., 2006; Pabon et al., 2007), la gran majoria dels animals analitzats de manera repetida durant aquests anys d'estudi va mantenir el mateix estatus serològic durant tota la durada de l'estudi (89,6%). La majoria dels animals que es varen trobar seropositius (ja fos des de l'inici de l'estudi, ja fos una nova infecció) varen seguir essent seropositius en els següents mostretjos tal i com s'ha observat amb anterioritat (Hietala and Thurmond 1999; Davison et al, 1999). Aquesta dada, ens indica una estabilitat de l'estat serològic enfront *N. caninum* en una gran majoria dels animals analitzats de manera repetida durant aquests anys d'estudi. Dels 39 animals del total de analitzats com a mínim dues vegades i que varen presentar resultats variables, 22 animals havien estat seronegatius en els mostrejos inicials i varen seroconvertir en anàlisis posteriors (5,9% del total dels animals analitzats en, almenys, dos mostrejos). Aquest fet ens indicaria que aquests animals han estat contagiats per *N. caninum* per via de transmissió horitzontal (ingesta d'ooquistes), corroborant la importància de la via horitzontal de transmissió en els ramats, esmentada anteriorment. També s'ha pogut observar que títols elevats d'anticossos anti- *N. caninum* poden persistir durant anys (Stenlund et al., 2003, Pabon et al., 2007).

També ha estat possible la observació de fluctuacions d'aquests anticossos durant la gestació de les mares o entre les diferents preses de mostres, tal i com ha succeït en diversos estudis que s'han realitzat (Quintanilla-Gozalo et al., 2000; Maley et al., 2001; Trees et al., 2002). No obstant, aquest fet s'ha observat en pocs animals.

Un estudi recent basat en mostrejar bovins de raça lletera anualment durant tres anys, indicava un 3,2% de seroconversió (Pabón et al., 2007). Aquests paràmetres de seroconversió indiquen que la seropositivitat enfront *N. caninum* pot ser molt estable al llarg del temps. Aquestes dades, reforcen encara més l'efectivitat que tenen els mostrejos anuals dels ramats, ja que s'hi pot observar l'efectivitat de les mesures de control preses, instaurar-ne de noves o introduir modificacions a les mesures ja establertes.

Tot i reflectir una prevalença individual relativament baixa, es va observar la relació de seropositivitat amb l'existència de problemes reproductius en els pocs animals de què es disposava de dades reproductives. Tal i com succeeix en les races d'aptitud lletera, no tots els animals seropositius varen presentar problemes reproductius. Les causes del per què uns animals seropositius avorten i d'altres no, no són clares, tot i que se sospita que sigui degut a fenòmens multicausals. Factors com els nivells d'anticossos durant la gestació (Paré et al., 1997), infeccions víriques concurrents com el BVD (Björkman et al., 2000), agents immunosupressors presents en aliments mal conservats (Bartels et al., 1999) o factors hereditaris (Björkman et al., 1996), sembla que podrien contribuir a augmentar el risc d'avortament en animals infectats per *Neospora*.

Sovint, les causes d'avortament són difícils de determinar. Només s'obté un diagnòstic definitiu en un 23-46% dels avorts sotmesos a tècniques de diagnòstic laboratorial (Kirkbridge, 1992). Es considera que la majoria d'avortaments, especialment durant el primer trimestre, són deguts a causes no infeccioses com alteracions genètiques, teratogèniques, desordres nutricionals, situacions derivades del maneig, condicions ambientals, plantes tòxiques, asincronia hormonal, corticoesteroides, problemes físics, endotoxines (Larsson, 1996). Els agents infecciosos com virus, bacteris, fongs, llevats o protozous poden provocar avortaments (Barr and Anderson, 1993; Larsson, 1996) essent més freqüents a partir del segon trimestre de gestació. El virus de la diarrea vírica bovina (BVD), *Listeria monocitogenes*, *Brucella abortus*, *Chlamydia spp*, *Leptospira hardjo*, *Tritrichomonas foetus*, *Ureaplasma diversum* i herpesvirus boví tipus 1 (BHV-1), IBR i especialment *N. caninum* són agents de distribució mundial causants d'avortaments. En general, les causes d'avortament en bovins d'aptitud càrnia en extensiu són encara més desconegudes que en les races d'aptitud lletera, degut sobretot a la dificultat d'obtenir teixits avortats en bones condicions i a problemes d'identificació dels animals que han patit l'avortament (Dubey, 2005). A part de *Neospora*, altres causes principals d'avortament a Andorra són BVD i IBR. Tot i això, tal i com s'ha indicat anteriorment, els animals estan integrats en programes vacunals estrictes enfront aquests agents vírics. Aquestes vacunacions i el diagnòstic d'antígen

víric en algunes de les mostres estudiades ens permeten descartar pràcticament aquests virus com a causa d'avortament d'aquests bovins estudiats.

A Espanya, diferents estudis han determinat que entre el 27% i el 57% dels avortaments diagnosticats eren deguts a *N. caninum* (Gonzalez et al., 1999; Pereira-Bueno et al., 2003). Durant l'estudi realitzat al Principat d'Andorra, un 61,53% dels fetus avortats analitzats varen ser positius a *N. caninum* mitjançant el diagnòstic per PCR.

El procediment més complert de diagnòstic de la neosporosi sembla ser el que es basa en estudis histològics per tal d'evidenciar lesions associades a *N. caninum*, i un cop detectades aquestes lesions, confirmar la presència del paràsit mitjançant tècniques de IHC o PCR. Desafortunadament en moltes ocasions no varem poder analitzar els teixits histològicament degut al seu estat d'autòlisi, i només varem analitzar part del SNC, degut a que és l'òrgan d'elecció per a confirmar la presència del paràsit - la majoria de les lesions i presència del paràsit en els fetus diagnosticats, es presenten al SNC, degut al neurotropisme característic de *N. caninum* - (Dubey, 1999b). Varem observar una bona relació entre la serologia de la mare en el moment de patir l'avortament i el diagnòstic de *N. caninum* mitjançant PCR. D'un total de 8 parelles fetus-mare en què es coneixia l'estatus serològic de la mare, 3 fetus procedents de mares seropositives varen donar resultat positiu a PCR i 4 fetus avortats per mares seronegatives varen resultar ser negatius al diagnòstic per PCR. Ha estat d'interès un cas en què la mare va resultar ser seronegativa en el moment de patir l'avortament però el SNC del fetus va donar resultat positiu a PCR. S'han pogut observar resultats similars en casos concrets de bovins de raça lletera (Nogareda et al. 2007). Una explicació possible sigui que la vaca estava en mala condició corporal i el seu estat fisiològic no era bo, fet que podria impedir la presència d'anticossos enfront del paràsit en el moment de l'avortament. Tot i que es presenten pocs casos com aquest, suposen certa preocupació per aconseguir diagnòstics acurats.

En un dels fetus amb lesions compatibles amb una infecció per *Neospora*, no se'n va poder confirmar la presència, ja que la mostra serològica de la mare en el

moment de l'avortament va ser negativa, així com també varen ser negatives les proves de PCR i IHC practicades en teixits del fetus avortat. En aquest cas, *N.caninum* pot ser descartada amb molta probabilitat com a causa d'aquest avortament.

Tot i que hi ha estudis que indiquen que l'eliminació d'animals seropositius a *N. caninum* en explotacions on no hi ha problemes d'avortaments deguts a *N. caninum* no ajuda a eradicar el paràsit del ramat (Hernandez et al., 2002), en el nostre cas, conèixer l'estat serològic dels bovins del Principat d'Andorra, ens ha estat útil per conèixer la situació del país enfront aquesta malaltia i ens permet establir pautes de control i eradicació de la neosporosi al Principat, tal i com s'ha demostrat en estudis anteriors realitzats sobre explotacions lleteres (Dijkstra et al., 2003; Larson et al., 2004; López Gatiús et al., 2004a).

Cada quadre d'avortament suposa una pèrdua econòmica important pel ramader, que es reflecteix en costos de veterinari, tractament de l'animal, analítiques i costos d'oportunitat referents a l'engreix, problemes reproductius, pèrdua de reposició, etc. A Andorra hi ha primes econòmicament importants destinades a vaques adultes en producció, a vedelles nascudes destinades a la reposició i a animals destinats al programa de Carn de Qualitat d'Andorra. Per això, i basant-nos en Armengol et al., (2006) una vaca avortada suposa una pèrdua econòmica pel ramader d'entre 950 i 1400 euros, depenent de si l'animal nascut hagués estat destinat a reposició o a engreix.

PLANS D'ACTUACIÓ.

Havent analitzant els resultats obtinguts en aquest estudi, plantegem els següents plans d'actuació diagnòstica i de control del paràsit a les explotacions andorranes:

Pla d'actuació diagnòstica dels paràsit

En futurs casos d'avortaments amb sospita d'infecció per *N. Caninum* es recomana:

1. Diagnòstic serològic de *N. caninum* de la mare.
2. Diagnòstic serològic de *N. caninum* del fetus avortat.
3. Diagnòstic serològic de *N. caninum* del ramat a què pertany l'animal avortat. Seguiment periòdic (semestral o anual).
4. Diagnòstic histopatològic del fetus. Demostrar la presència de *N. caninum* en teixits i òrgans diana del fetus avortat: SNC, cor, fetge i pulmó. Anàlisi de lesions i confirmació de la presència del paràsit mitjançant IHC, PCR o ambdues.
5. Diagnòstic histopatològic de l'adult. Demostrar la presència de *N. caninum* en teixits maternals: placenta si és possible.

Pla de control del paràsit a les explotacions

1. Mares adultes seropositives: controlar i eliminar les secundines en parts normals i avortaments. Monitoritzar la producció d'aquests animals, sobretot de la descendència i les dades reproductives.
2. Descartar vedelles filles o nétes de vaques seropositives per a reposició. Serologia a partir dels 6 mesos de vida, si l'interès reproductiu és elevat.
3. Controlar l'accés de gossos foranis i cànids salvatges a les pastures i zones d'alimentació i magatzems aliment de l'explotació.
4. Control serològic dels gossos de l'explotació. Restringir el contacte entre gossos i el ramat (especial vigilància en instal·lacions del peripart i alimentació).
5. Control higiènic d'aigua, pinso i farratges.

6. Convèncer al ramader de la importància d'una bona profilaxi: serologia anual de tots els bovins majors de 6 mesos, diagnòstic de tots els avortaments sempre que sigui possible, serologia de reposició comprada en d'altres explotacions (preferiblement en origen).

Mesures de control de pràctica general

1. Serologies periòdiques dels bovins majors de 6 mesos d'edat destinats a la reproducció. Considerem important controlar els mascles reproductors que siguin seropositius tot i que la via seminal es molt limitada o nula.
2. Serologia dels gossos d'atura.
3. Eliminació acurada de despulles de parts i avortaments.
4. Monitorització de la genealogia dels animals.
5. Control rigorós de carnívors, especialment cànids, a pastures, magatzems i instal·lacions.

*Mesures concretes derivades d'aquest estudi per erradicar la presència de *N. caninum* als bovins del Principat*

Les mesures que es proposen en aquest apartat s'han definit assumint la realitat pràctica del sistema productiu boví d'Andorra, que comporta unes condicions d'estandarització de raça de tota la cabana bovina del país (Bruna d'Andorra) i uns estandars de producció semi-extensiva concrets (Segell Carn de Qualitat d'Andorra).

1. Estandardització dels criteris de creuaments: Mares reproductores de raça Bruna d'Andorra. Braus de raça Bruna d'Andorra i llemosina. Tal i com hem vist en aquest i altres estudis realitzats, els animals de raça llemosina i els seus creuaments presenten menor taxa d'infecció que les altres races. Si a aquesta observació li afegim l'avantatge que és una de les races càrnies amb més facilitat de part, creiem important fer ús d'aquests braus en femelles seropositives o sospitoses de ser seropositives a *N. caninum* i/o femelles de primer part o de tamany petit.

2. Conservar els criteris de separació per grups d'edat a les pastures d'alta muntanya: La pastura separada dels animals joves en llocs poc accessibles, a part d'afavorir un bon maneig de l'edat del primer i segon parts del ramat, limita l'accés a aquestes pastura de gossos de manera important. Pastures on no hi arriben turistes, caçadors.
3. Informació de la població i limitació dels gossos a les zones de pastura: La instal.lació de cartells informatius per restringir el pas de gossos en determinades pastures, demanar col.laboració dels propietaris de gossos (recollida dels excrements) informant dels riscos sanitaris pels bovins; pot ser una mesura important pel control de la malaltia i poc costosa econòmicament.

En conclusió, l'eradicació de *N. caninum* a Andorra és possible, sempre i quan s'exerceixi un control estricte sobre les pastures i l'accés que hi puguin tenir els HD.

CONCLUSIONS DE L'ESTUDI.

- *Neospora caninum* és present en un percentatge elevat a les explotacions de boví d'aptitud càrnia del Principat d'Andorra (més del 84% dels 26 ramats analitzats han presentat almenys un animal seropositiu) i la situació de l'infecció és endèmica.
- La taxa d'infecció individual als ramats és baixa, amb una seroprevalença mitjana del 7,4%.
- Els principals factors de risc que afecten la seroprevalença individual dels bovins del Principat d'Andorra són: l'edat de l'animal, la Parròquia a què pertanyen i la raça.
- Els animals majors de 4 anys de vida tenen 1,64 cops més possibilitats de ser seropositius que els animals més joves, indicant que la principal via de transmissió de la infecció als ramats d'Andorra és la via horitzontal.
- Les zones de pastura d'alta muntanya i les seves particularitats influeixen en la prevalença de la neoporosi dels bovins del Principat d'Andorra.
- Existeixen diferències entre races en quant a la susceptibilitat de contraure la malaltia. Els animals de raça llemosina i els seus creuaments presenten unes seroprevalències 6,7 vegades més baixes que la resta de les races i els seus creuaments.
- Es va a observar una alta estabilitat de l'estat serològic enfront *N. caninum* en la majoria dels animals analitzats de manera repetida durant l'estudi, a més títols elevats d'anticossos contra *N. caninum* poden persistir durant almenys 4 anys.
- *Neospora caninum* és causa d'avortaments a les explotacions del Principat causant pèrdues econòmiques importants. Un 61,53% dels fetus avortats analitzats varen ser positius a *N. caninum* mitjançant el diagnòstic per PCR.

BIBLIOGRAFIA.

- Andrianarivo AG, Barr BC, Anderson ML, Rowe JD, Packham AE, Sverlow KW, Conrad PA. Immune responses in pregnant cattle and bovine fetuses following experimental infection with *Neospora caninum*. *Parasitol Res.* 2001;87(10):817-825.
- Almería S, Ferrer D, Pabón M, Castellà J, Mañas S. Red foxes (*Vulpes vulpes*) are a natural intermediate host of *Neospora caninum*. *Vet Parasitol.* 2002;107:287-294.
- Almería S, De Marez T, Dawson H, Araujo R, Dubey JP, Gasbarre LC. Cytokine gene expression in dams and foetuses after experimental *Neospora caninum* infection of heifers at 110 days of gestation. *Parasite Immunol.* 2003;25(7):383-392.
- Almería S, Vidal D, Ferrer D, Pabón M, Fernández-de-Mera MI, Ruiz-Fons F, Alzaga V, Marco I, Calvete C, Lavin S, Gortazar C, López-Gatius F, Dubey JP. Seroprevalence of *Neospora caninum* in non-carnivorous wildlife from Spain. *Vet Parasitol.* 2007;143(1):21-28.
- Anderson, M.L., Blanchard, P.C., Barr, B.C., Dubey, J.P., Hoffman, R.L., Conrad, P.A. *Neospora*-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. *JAVMA* 1991;198(2):241-244.
- Anderson ML, Palmer CW, Thurmond MC, Picanso JP, Blanchard PC, Breitmeyer RE, Layton AW, McAllister M, Daft B, Kinde H. Evaluation of abortions in cattle attributable to neosporosis in selected dairy herds in California. *JAVMA* 1995;207:1206-1210.
- Anderson ML, Reynolds JP, Rowe JD, Sverlow KW, Packham AE, Barr BC, Conrad PA. Evidence of vertical transmission of *Neospora* sp infection in dairy cattle. *JAVMA* 1997;210:1169-1172.
- Armengol R, Pabón M, Adelantado C, López-Gatius F, Almería S. First report of *Neospora caninum* abortion in a beef cow-calf herd from Andorra, Europe. *J Parasitol.* 2006; 92(6):1361-1362.
- Baillargeon P, Fecteau G, Paré J, Lamothe P, Sauvé R. Evaluation of the embryo transfer procedure proposed by the International Embryo Transfer Society as a method of controlling vertical transmission of *Neospora caninum* in cattle. *JAVMA* 2001;11:1803-1806.
- Bañales P, Fernandez L, Repiso MV, Gil A, Dargatz DA, Osawa T. A nationwide survey on seroprevalence of *Neospora caninum* infection in beef cattle in Uruguay. *Vet Parasitol.* 2006 Jun 30;139(1-3):15-20. Epub 2006 Apr 18
- Barber JS, Gasser RB, Ellis J, Reichel MP, McMillan D, Trees AJ. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in different canid populations. *J Parasitol.* 1997;83(6):1056-1058.
- Barber J S, Trees AJ. Clinical aspects of 27 cases of neosporosis in dogs. *The Vet. Rec.*, 1996; 2:439-443.
- Barber JS, Trees AJ. Naturally occurring vertical transmission of *Neospora caninum* in dogs. *Int. J. Paras.* 1998;28:57-64.
- Barber JS, Holmdahl OJ, Owen MR, Guy F, Uggla A, Trees AJ. Characterization of the first European isolate of *Neospora caninum* (Dubey, Carpenter, Speer, Topper and Uggla). *Parasitology.* 1995; 111(Pt 5):563-568.
- Barber JS, Payne-Johnson CE, Trees AJ. Distribution of *Neospora caninum* within the central nervous system and other tissues of six dogs with clinical neosporosis. *J Small Anim Pract.* 1996;37(12):568-574.
- Barberán M, Cebrián L, Gil J. Identificación de *Neospora* sp. En brotes de aborto en ganado bovino en Aragón. *ITEA*, 1997;18:621-623.
- Barling KS, Sherman M, Peterson MJ, Thompson JA, McNeill JW, Craig TM, Adams LG. Spatial associations among density of cattle, abundance of wild canids, and seroprevalence to *Neospora caninum* in a population of beef calves. *J Am Vet Med Assoc.* 2000;217(9):1361-1365.

- Barr BC, Anderson ML, Dubey JP, Conrad PA. *Neospora*-like protozoal infections associated with bovine abortions. *Vet Pathol.*, 1991;28:110-116.
- Barr BC, Anderson ML. Infectious diseases causing bovine abortion and fetal loss. *Veterinary clinics of North America: Food Animal Practice.* 1993; 9:343-368.
- Barr BC, Conrad PA, Sverlow K, Tarantal AF, Hendrickx AG. Experimental fetal and transplacental *Neospora* infection in the nonhuman primate. *Laboratory Investigation* 1994;71:236-242.
- Bartels CJ, Arnaiz-Seco JI, Ruiz-Santa-Quitera A, Bjorkman C, Frossling J, von Blumroder D, Conraths FJ, Schares G, van Maanen C, Wouda W, Ortega-Mora LM. Supranational comparison of *Neospora caninum* seroprevalences in cattle in Germany, The Netherlands, Spain and Sweden. *Vet Parasitol.* 2006;137(1-2):17-27.
- Bartels CJM, Wouda W, Schukken YH. Risk factors for *Neospora caninum*-associated abortion storms in dairy herds in The Netherlands (1995 to 1997). *Theriogenology* 1999; 52:247-257.
- Bartley PM, Kirvar E, Wright S, Swales C, Esteban-Redondo I, Buxton D, Maley SW, Schock A, Rae AG, Hamilton C, Innes EA. Maternal and fetal immune responses of cattle inoculated with *Neospora caninum* at mid-gestation. *J Comp Pathol.* 2004;130(2-3):81-91
- Basso W, Venturini L, Venturini MC, Hill DE, Kwok OC, Shen SK, Dubey JP. First isolation of *Neospora caninum* from the feces of a naturally infected dog. *J. Parasitol* 2001;87(3):612-628.
- Baszler TV, Long MT, McEwin TF, Mathison BA. Interferon-II and interleukin 12 mediate protection to acute *Neospora caninum* infection in BALB/c mice. *Int J Parasitol.*, 1999; 29:1635-1646.
- Bielansky A, Robinson J, Phipps-Todd B. Effect of *Neospora caninum* on *in vitro* development of preimplantation stage bovine embryos and adherence to the zona pellucida. *Veterinary Record* 2002;150: 316-318.
- Bjerkas I, Mohn SF, Presthus J. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Z. Parasitenkd.* 1984; 70:271-274.
- Bjerkas I, Presthus J. Immuno-histochemical and ultrastructural characteristics of a cyst-forming sporozoon associated with encephalomyelitis and myositis in dogs. *APMIS.* 1988; 96(5):445-454.
- Bjerkas I, Presthus J. The neuropathology in toxoplasmosis-like infection caused by a newly recognized cyst-forming sporozoon in dogs. *APMIS* 1989; 97(5):459-68.
- Björkman C, Uggla A. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. *Int J Parasitol.* 1999; 29(10) 1497-1507.
- Björkman CS, Johansson O, Stenlund S, Holmdahl OJM, Uggla A. *Neospora* species infection in a herd of dairy cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1996;208:1441-1444.
- Björkman C, Holmdahl OJ, Uggla A. An indirect enzyme-linked immunoassay (ELISA) for demonstration of antibodies to *Neospora caninum* in serum and milk of cattle. *Vet Parasitol.* 1997;68(3) 251-260.
- Björkman CS, Alenius S, Emanuelsson U, Uggla A. *Neospora caninum* and bovine virus diarrhoea virus infections in Swedish dairy cows in relation to abortion. *Vet J* 2000;159:201-206.
- Butlletí Oficial del Principat d'Andorra. 2003;57:25.
- Buxton D, McAllister MM, Dubey JP. The comparative pathogenesis of neosporosis. *Trends Parasitol.* 2002;18(12):546-52. Review.

- Caetano-da-Silva A, Ferre I, Aduriz G, Alvarez-García G, del-Pozo I, Atxaerandio R, Regidor-Cerrillo J, Ugarte-Garagalza C, Ortega-Mora LM. *Neospora caninum* infection in breeder bulls: seroprevalence and comparison of serological methods used for diagnosis. *Vet Parasitol.* 2004;124(1-2):19-24.
- Chaouat G, Zourbas S, Ostojic S, Lappree-Delage G, Dubanchet S, Ledee N, Martal J. A brief review of recent data on some cytokine expressions at the materno-foetal interface which might challenge the classical Th1/Th2 dichotomy. *J Reprod Immunol.* 2002 Jan;53(1-2):241-56. Review.
- Conrad PA, Sverlow K, Anderson M, Rowe J, BonDurant R, Tuter G, Breitmeyer R, Palmer C, Thurmond M, Ardans A, Dubey JP, Duhamel G, Barr B. Detection of serum antibody responses in cattle with natural or experimental *Neospora* infections. *J Vet Diagn. Invest.* 1993;5:572-578.
- Davison HC, Otter A, Trees AJ. Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle. *Int J Parasitol.* 1999; 29(10):1683-1690.
- De Marez T, Liddell S, Dubey JP, Jenkins MC, Gasbarre L. Oral infection of calves with *Neospora caninum* oocysts from dogs: humoral and cellular immune responses. *Int J Parasitol.* 1999; 29:1647-1657.
- De Merschman F, Focant C, Boreux R, Leclipteux T, Losson B. Cattle neosporosis in Belgium: a case-control study in dairy and beef cattle. *Int. J. Parasitol.* 2000; 30:887-890.
- De Meerschman F, Speybroeck N, Berkvens D, Rettinger C, Leclipteux T, Cassart D, Losson B. Fetal infection with *Neospora caninum* in dairy and beef cattle in Belgium. *Theriogenology*, 2002;58:933-945.
- Dijkstra T, Eysker M, Schares G, Conraths FJ, Wouda W, Barkema HW. Dogs shed *Neospora caninum* oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrum spiked with *Neospora caninum* tachyzoites. *Int J Parasitol.* 2001;(8):747-752.
- Dijkstra T, Barkema HW, Eysker M, Beiboer ML, Wouda W. Evaluation of a single serological screening of dairy herds for *Neospora caninum* antibodies. *Vet Parasitol.* 2003;110(3-4):161-169.
- Dubey JP. Recent advances in *Neospora* and neosporosis. *Vet Parasitol.*, 1999a;67 1-59.
- Dubey JP. Neosporosis--the first decade of research. *Int J Parasitol.* 1999b; (10):1485-8.
- Dubey JP. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *Korean J Parasitol.* 2003;41(1):1-16. Review.
- Dubey JP. Neosporosis in cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2005;21(2):473-483.
- Dubey JP, Barr BC, Barta JR, Bjerkås I, Björkman C, Blagburn BL, Bowman DD, Buxton D, Ellis JT, Gottstein B, Hemphill A, Hill DE, Howe DK, Jenkins MC, Kobayashi Y, Koudela B, Marsh AE, Mattsson JG, McAllister MM, Modrý D, Omata Y, Sibley LD, Speer CA, Trees AJ, Uggla A, Upton SJ, Williams DJ, Lindsay DS. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. *Int J Parasitol.* 2002;32(8):929-946.
- Dubey JP, Lindsay DS. Neosporosis. *Paras. Today* 1993; 9:452-458.
- Dubey JP, Lindsay DS. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Vet Parasitol.*, 1996; 67:1-59.
- Dubey JP, Schares G. Diagnosis of bovine neosporosis. *Vet Parasitol.* 2006 Aug 31;140(1-2):1-34.
- Dubey JP, Thulliez P. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in wild animals. *J Parasitol.* 2005; 91(5):1217-1278.
- Dubey JP, Hattel AL, Lindsay DS, Topper MJ. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: Isolation of the causative agent and experimental transmission. *JAVMA* 1988;193(10):1259-1263.

- Dubey JP, Buxton D, Wouda W. Pathogenesis of bovine neosporosis. *J Comp Pathol.* 2006 May;134(4):267-289.
- Ellis JT. Polymerase chain reaction approaches for the detection of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol.* 1998; 28(7):1053-1060.
- Eperon S, Brönnimann K, Hemphill A, Gottstein B. Susceptibility of B-cell deficient C57BL/6 (microMT) mice to *Neospora caninum* infection. *Parasite Immunol.* 1999; 21(5):225-236
- Ferroglio E, Wambwa E, Castiello M, Trisciuglio A, Prouteau A, Pradere E, Ndungu S, De Meneghi D. Antibodies to *Neospora caninum* in wild animals from Kenya, East Africa. *Vet Parasitol.* 2003;118(1-2):43-49.
- Fioretti, D., Pasquali, P., Diaferia, M., Mangili, V., Rosignoli, L. *Neospora caninum* infection and congenital transmission: serological and parasitological study of cows up to the fourth gestation. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 2003;50,399-404.
- Fondevila D, Añor S, Pumarola M, Dubey JP. *Neospora caninum* identification in an aborted bovine fetus in Spain. *Vet Parasitology.*, 1998; 77:187-190.
- French NP, Clancy D, Davison HC, Trees AJ. Mathematical models of *Neospora caninum* infection in dairy cattle: transmission and options for control. *Int J Parasitol.*, 1999; 29 (10):1691-1704.
- Gondim LF, McAllister MM, Pitt WC, Zemlicka DE. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol.* 2004;34(2):159-161.
- Gonzalez L, Buxton D, Atxaerandio R, Aduriz G, Maley S, Marco J, Cuervo L. Bovine abortion associated with *Neospora caninum* in northern Spain. *Vet Rec.*, 1999; 144: 145-150.
- Gottstein B, Hentrich B, Wyss R, Thur B, Busato A, Stark KDC, Muller N. Molecular and immunodiagnostic investigations on bovine neosporosis in Switzerland. *Int. J. Parasitol.* 1998; 28:679-691.
- Graham DA, Calvert V, Whyte M, Marks J. Absence of serological evidence for human *Neospora caninum* infection. *Vet Rec.* 1999;144(24):672-673.
- Guy CS, Williams DJL, Kelly DF, McGarry JW, Guy F, Björkman C, Smith RF, Trees AJ. *Neospora caninum* in persistently infected, pregnant cows: spontaneous transplacental infection is associated with an acute increase in maternal antibody. *Vet Rec.* 2001;149(15):443-9
- Hall CA, Reichel MP, Ellis JT. Prevalence of *Neospora caninum* infection in Australian (NSW) dairy cattle estimated by a newly validated ELISA for milk. *Vet Parasitol.* 2006;142(1-2):173-178.
- Häsler B, Regula G, Stärk KD, Sager H, Gottstein B, Reist M. Financial analysis of various strategies for the control of *Neospora caninum* in dairy cattle in Switzerland. *Prev Vet Med.* 2006a;77(3-4):230-253.
- Häsler B, Stärk KD, Sager H, Gottstein B, Reist M. Simulating the impact of four control strategies on the population dynamics of *Neospora caninum* infection in Swiss dairy cattle. *Prev Vet Med.* 2006b;77(3-4):254-283.
- Hemphill A. The host-parasite relationship in neosporosis. *Adv Parasitol.* 1999; 43:47-104.
- Hemphill A, Gottstein B, Kaufmann H. Adhesion and invasion of bovine endothelial cells by *Neospora caninum*. *Parasitol.* 1996; 112:183-197.
- Hernández JR, Risco C, Donovan A. Association between exposure to *Neospora caninum* and milk production in dairy cows. *JAVMA* 2001; 219 (5):632-635.

- Hernández J, Risco C, Donovan A. Risk of abortion associated with *Neospora caninum* during different lactations and evidence of congenital transmission in dairy cows. *J Am Vet Med Assoc.* 2002; 221(12):1742-1746.
- Hoar BR, Ribble CS, Spitzer CC, Spitzer PG, Janzen ED. Investigation of pregnancy losses in beef cattle herds associated with *Neospora* sp. infection. *Can Vet J.* 1996;37(6):364-366.
- Hobson, J.C., Duffield, T.F., Kelton, D., Lissemore, K., Hietala, S.K., Leslie, K.E., McEwen, B., Cramer, G., Peregrine, A.S. *Neospora caninum* serostatus and milk production of Holstein cattle. *JAVMA* 2002; 221(8):1160-1164.
- Holmdahl OJM, Mattsson JG. Rapid and sensitive identification of *Neospora caninum* by in vitro amplification of the internal transcribed spacer 1. *Parasitology*, 1996;112 177-182.
- Innes EA, Panton WR, Marks J, Trees AJ, Holmdahl J, Buxton D. Interferon gamma inhibits the intracellular multiplication of *Neospora caninum*, as shown by incorporation of 3H uracil. *J Comp Pathol.* 1995 Jul;113(1):95-100.
- Innes EA, Buxton D, Maley S, Wright S, Marks J, Esteban I, Rae A, Schock A, Wastling J. Neosporosis. Aspects of epidemiology and host immune response. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;916:93-101.
- Innes EA, Wright SE, Maley S, Rae A, Schock A, Kirvar E, Bartley P, Hamilton C, Carey IM, Buxton D. Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. *Int J Parasitol.* 2001;31(13):1523-1534.
- Innes EA, Andrianarivo AG, Björkman C, Williams DJ, Conrad PA. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. *Trends Parasitol.* 2002; 18(11):497-504.
- Innes EA, Wright S, Bartley P, Maley S, Macaldowie C, Esteban-Redondo I, Buxton D. The host-parasite relationship in bovine neosporosis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2005;108(1-2):29-36.
- Hosmer DW, Lemeshow S. *Applied Logistic Regression.* New York: Wiley, 1989.
- Jardine, J.E. The ultrastructure of bradyzoites and tissue cysts of *Neospora caninum* in dogs: absence of distinguishing morphological features between parasites of canine and bovine origin. *Vet Parasitol.* 1996; 62(3-4) 231-40.
- Kaufmann H, Yamage M, Roditi I, Dobbelaere D, Dubey JP, Holmdahl OJM, Trees A, Gottstein B, 1996. Discrimination of *Neospora caninum* from *Toxoplasma gondii* and other apicomplexan parasites by hybridisation and PCR. *Mol. Cell Probes.* 1996;10:289-297.
- Khan IA, Schwartzman JD, Fonseka S, Kasper LH. *Neospora caninum*: role for immuno cytokines in host immunity. *Exp. Parasitol.* 1997; 85 24-34.
- Kirkbridge CA. Etiologic agents detected in a 10 year study of bovine abortions and stillbirths. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.* 1992;4:175-180.
- Koiwai M, Hamaoka T, Haritani M, Shimizu S, Tsutsui T, Eto M, Yamane I. Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy and beef cattle with reproductive disorders in Japan. *Vet Parasitol.* 2005 Jun 10;130(1-2):15-8. Epub 2005 Apr 12.
- Larson RL, Hardin DK, Pierce VL. Economic considerations for diagnostic and control options for *Neospora caninum*-induced abortions in endemically infected herds of beef cattle. *J Am Vet Med Assoc.* 2004;224(10):1597-604.
- Larsson B. Diagnosing the cause of bovine abortions and other perinatal deaths. *Veterinary Medicine.* 1996; 478- 486.
- Liddell S, Jenkins MC, Dubey JP. A competitive PCR assay for quantitative detection of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* 1999;29,1583-1587.

- Lindsay DS, Dubey JP. Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. *Am. J. Vet. Res.* 1989; 50:1981-1983.
- Lindsay DS, Blagburn BL, Dubey JP. Factors affecting the survival of *Neospora caninum* bradyzoites in murine tissues. *J. Parasitol.* 1992;78(1):70-72.
- Lindsay DS, Speer CA, Toivio-Kinnucan MA, Dubey JP, Blagburn BL. Use of infected cultured cells to compare ultrastructural features of *Neospora caninum* from dogs and *Toxoplasma gondii*. *Am J Vet Res.* 1993;54(1):103-106.
- Lindsay DS, Kelly EJ, McKown RD, Stein FJ, Plozer J, Herman J, Blagburn BL, Dubey JP. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in coyotes (*Canis latrans*) and experimental infections of coyotes with *Neospora caninum*. *J Parasitol.* 1996;82(4):657-659.
- Lindsay DS, Upton SJ, Dubey JP. A structural study of *Neospora caninum* oocyst. *Int J Parasitol.*, 1999; 29 (10):1521-1524.
- Lindsay DS, Weston JL, Little SE. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in gray foxes (*Urocyon cinereoargenteus*) from South Carolina. *Vet Parasitol.* 2001;97(2):159-164.
- Lobato J, Silva DA, Mineo TW, Amaral JD, Segundo GR, Costa-Cruz JM, Ferreira MS, Borges AS, Mineo JR. Detection of immunoglobulin G antibodies to *Neospora caninum* in humans: high seropositivity rates in patients who are infected by human immunodeficiency virus or have neurological disorders. *Clin Vaccine Immunol.* 2006, 13(1):84-89.
- Long MT, Baszler TV. Neutralization of maternal IL-4 modulates congenital protozoal transmission: comparison of innate versus acquired immune responses. *J Immunol.* 2000;164(9):4768-4774.
- López-Gatius F, López-Béjar M, Murugavel K, Pabón M, Ferrer D, Almería S. *Neospora*-associated abortion episode over a 1-year period in a dairy herd in North-East Spain. *J Vet Med B* 2004a, 51(7):348-352.
- López-Gatius F, Pabón M, Almería S. *Neospora caninum* infection does not affect early pregnancy in dairy cattle. *Theriogenology.* 2004b; 62: 606-613.
- López-Gatius F, García-Ispierto I, Santolaria P, Yániz JL, López-Béjar M, Nogareda C, Almería S. Relationship between rainfall and *Neospora caninum*-associated abortion in two dairy herds in a dry environment. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 2005a;52(3):147-52.
- Lopez-Gatius F, Santolaria P, Yaniz JL, Garbayo JM, Almeria S. The use of beef bull semen reduced the risk of abortion in *Neospora*-seropositive dairy cows. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 2005b;52(2):88-92.
- López-Gatius F, Almería S, Donofrio G, Nogareda C, García-Ispierto I, Bech-Sabat G, Santolaria P, Yániz JL, Pabón M, de Sousa NM, Beckers JF. Protection against abortion linked to gamma interferon production in pregnant dairy cows naturally infected with *Neospora caninum*. *Theriogenology.* 2007;68(7):1067-73.
- Lunden A, Marks J, Maley SW, Innes EA. Cellular immune responses in cattle experimentally infected with *Neospora caninum*. *Parasite Immunol.* 1998; 20(11):519-526.
- Mainar Jaime, R.C., Thurmond, M.C., Berzal Herranz, B., Hietala, S.K. Seroprevalence of *Neospora caninum* and abortion in dairy cows in northern Spain. *Vet record.*, 1999; 145:72-75.
- Maley SW, Buxton D, Thomson KM, Schriefer CE, Innes EA. Serological analysis of calves experimentally infected with *Neospora caninum*: a 1-year study. *Vet Parasitol.* 2001 Mar 5;96(1):1-9.
- Marks J, Lundén A, Harkins D, Innes E. Identification of *Neospora* antigens recognized by CD4+ T cells and immune sera from experimentally infected cattle. *Parasite Immunol.* 1998 Jul;20(7):303-309.

- McAllister MM, Huffman EM, Hietala SK, Conrad PA, Anderson ML, Salman Mo D. Evidence suggesting a point source exposure in an outbreak of bovine abortion due to neosporosis. *J Vet Diagn Invest*, 1996;8:355- 357.
- McAllister MM, Dubey JP, Lindsay DS, Jolley WR, Wills RA, McGuire AM. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol.*, 1998;28:1473-1478.
- McAllister, M.M., Bjorkman, C., Anderson-Sprecher, R., Rogers, D.G. Evidence of point-source exposure to *Neospora caninum* and protective immunity in a herd of beef cows. *JAVMA* 2000;217(6) 881-887.
- McGarry JW, Stockton CM, Williams D, Trees AJ. Protracted shedding of oocysts of *Neospora caninum* by a naturally infected foxhound. *J Parasitol.* 2003;89(3):628-630.
- Moen AR, Wouda W, Mul MF, Graat EAM, van Werven T. Increased risk of abortion following *Neospora caninum* abortion outbreaks: a retrospective and prospective cohort study in four dairy herds. *Theriogenology* 1998;49:1301-1309.
- Moore DP, Campero CM, Odeón AC, Posso MA, Cano D, Leunda MR, Basso W, Venturini MC, Späth E. Seroepidemiology of beef and dairy herds and fetal study of *Neospora caninum* in Argentina. *Vet Parasitol.* 2002 Aug 22;107(4):303-16.
- Naguleswaran A, Alaeddine F, Guionaud C, Vonlaufen N, Sonda S, Jenoe P, Mevissen M, Hemphill A. *Neospora caninum* protein disulfide isomerase is involved in tachyzoite-host cell interaction. *Int J Parasitol.* 2005; 35(13):1459-1472.
- Nogareda C, López-Gatius F, Santolaria P, García-Ispuerto I, Bech-Sabat G, Pabón M, Mezo M, Gonzalez-Warleta M, Castro-Hermida JA, Yániz J, Almería S. Dynamics of anti-*Neospora caninum* antibodies during gestation in chronically infected dairy cows. *Vet Parasitol.* 2007;148(3-4):193-199.
- Ortuño A, Castellà J, Almería S. Seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs from Spain. *J Parasitol.* 2002;88(6):1263-1266.
- Pabón M, López-Gatius F, García-Ispuerto I, Bech-Sabat G, Nogareda C, Almería S. Chronic *Neospora caninum* infection and repeat abortion in dairy cows: a 3-year study. *Vet Parasitol.* 2007, 147(1-2):40-6.
- Packham AE, Sverlow KW, Conrad PA, Loomis EF, Rowe JD, Anderson ML, Marsh AE, Cray C, Barr BC. A modified agglutination test for *Neospora caninum*: Development, optimization, and comparison to the indirect fluorescent-antibody test and enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1998;5(4):467-473.
- Paré J, Hietala SK, Thurmond MC. An enzyme-linked immunosorbent (ELISA) for serological diagnosis of *Neospora* spp. Infection and abortion. **J. Parasitol., 1995. J. Vet. Diag. Invest. 7: 352-359.**
- Paré J, Thurmond MC, Hietala SK. Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calfhood mortality. *Can J Vet Res.* 1996; 60(2):133-139.
- Paré J, Thurmond MC, Hietala SK. *Neospora caninum* antibodies in cows during pregnancy as a predictor of congenital infection and abortion. *J Parasitol* 1997; 83:82-87.
- Pereira-Bueno J, Quintanilla-Gozaló A, Del Rio J, Ortega LM. Epidemiología II: transmisión y factores de riesgo. *Bovis* 1999;88:35-45.
- Pereira-Bueno J, Quintanilla-Gozaló A, Pérez-Pérez V, Espi-Felgueroso A, Alvarez-Garcia G, Collantes-Fernández E, Ortega-Mora LM. Evaluation by different diagnostic techniques of bovine abortion associated with *Neospora caninum* in Spain. *Vet. Parasitol.*, 2003;111:143-152.
- Peters AR, Ball PJH. *Reproduction in cattle*. 2nd ed. Blackwell Science Ltd. 1 II.1995.

- Peters M, Lütkefels E, Heckerroth AR, Schares G. Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle. *Int J Parasitol.* 2001;31(10):1144-8.
- Petersen E, Lebech M, Jensen L, Lind P, Rask M, Bagger P, Bjorkman C, Uggl A. *Neospora caninum* infection and repeated abortions in humans. *Emerg Infect Dis.* 1999;5(2):278-280.
- Quinn HE, Ellis JT, Smith NC. *Neospora caninum*: a cause of immune-mediated failure of pregnancy? *Trends Parasitol.* 2002;18(9):391-4. Review.
- Quintanilla-Gozalo, A., Pereira-Bueno, J., Tabares, E., Innes, E.A., González-Paniello, R., Ortega-Mora, L.M. Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dairy and beef cattle in Spain. *Int J Parasitol.* 1999; 29:1201-1208.
- Rebordosa X, Álvarez-García G, Collantes E, Ortega LM, Artigas C. Desarrollo de un ELISA indirecto para la valoración de anticuerpos contra *Neospora caninum*. *Laboratorio veterinario, Avedila.* 2000; 17:5-8.
- Roberts. *Veterinary obstetrics and genital diseases (theriogenology)*. 3rd ed. Woodstock, Vt. Stephen J. Roberts 125. 1986.
- Romand S, Thuillez P, Dubey JP. Direct agglutination test for serologic diagnosis of *Neospora caninum* infection. *J.P. Parasitol. Res.* 1998; 60:50-53.
- Rosypal AC, Lindsay DS. The sylvatic cycle of *Neospora caninum*: where do we go from here? *Trends Parasitol.* 2005;21(10):439-440
- Sanderson MW, Gay JM, Baszler TV. *Neospora caninum* seroprevalence and associated risk factors in beef cattle in the northwestern United States. *Vet Parasitol.* 2000 Jun 10;90(1-2):15-24.
- SAS. Technical report: release 8.2. SAS Institute Inc., Cary. NC, USA, 2001.
- Sawada M, Kondo H, Tomioka Y, Park C, Morita T, Shimada A, Umemura T. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected adult dairy cow. *Vet Parasitol.* 2000;90(3):247-252.
- Schares, G., Peters, M., Barwald, A., Conraths, F.J. The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analysed by serological techniques. *Vet Parasitol*, 1998; 80 87-98.
- Schares G, Wenzel U, Müller T, Conraths FJ. Serological evidence for naturally occurring transmission of *Neospora caninum* among foxes (*Vulpes vulpes*). *Int J Parasitol.* 2001 Apr;31(4):418-23.
- Schares G, Bärwald A, Staubach C, Söndgen P, Rauser M, Schröder R, Peters M, Wurm R, Selhorst T, Conraths FJ. p38-avidity-ELISA: examination of herds experiencing epidemic or endemic *Neospora caninum*-associated bovine abortion. *Vet Parasitol.* 2002;106(4):293-305.
- Schares G, Bärwald A, Staubach C, Wurm R, Rauser M, Conraths FJ, Schroeder C. Adaptation of a commercial ELISA for the detection of antibodies against *Neospora caninum* in bovine milk. *Vet Parasitol.* 2004;120(1-2):55-63.
- Sedlák K, Bártoová E. Seroprevalences of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in zoo animals. *Vet Parasitol.* 2006 Mar 31;136(3-4):223-31.
- Serrano-Martínez E, Ferre I, Martínez A, Osoro K, Mateos-Sanz A, Del-Pozo I, Aduriz G, Tamargo C, Hidalgo CO, Ortega-Mora LM. Experimental neosporosis in bulls: parasite detection in semen and blood and specific antibody and interferon-gamma responses. *Theriogenology.* 2007 Apr 1;67(6):1175-84. Epub 2007 Feb 21.

- Soldati S, Kiupel M, Wise A, Maes R, Botteron C, Robert N. Meningoencephalomyelitis caused by *Neospora caninum* in a juvenile fallow deer (*Dama dama*). *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*. 2004 Aug;51(6):280-
- Speer CA, Dubey JP. Ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites and tissue cysts of *Neospora caninum*. *J Protozool.*, 1989;36 (5):458-463.
- Stenlund S, Kindahl H, Magnusson U, Uggla A, Björkman C. Serum antibody profile and reproductive performance during two consecutive pregnancies of cows naturally infected with *Neospora caninum*. *Vet Parasitol*. 1999;85(4):227-34.
- Tanaka T, Hamada T, Inoue N, Nagasawa H, Fujisaki K, Suzuki N, Mikami T. The role of CD4(+) or CD8(+) T cells in the protective immune response of BALB/c mice to *Neospora caninum* infection. *Vet Parasitol*. 2000;90(3):183-191.
- Thilstedt JP, Dubey JP. *Neospora*-like abortions in a herd of dairy cattle. *J Vet Diagn Invest*. 1989;1:205-209
- Thurmond MC, Hietala SK. Effect of *Neospora caninum* on milk production in first-lactating dairy cows. *JAVMA* 1997a;210 (5):672-674.
- Thurmond MC, Hietala SK, Blanchard PCJ. Herd-based diagnosis of *Neospora caninum*-induced endemic and epidemic abortion in cows and evidence for congenital and postnatal transmission. *J. Vet Diagn Invest*. 1997b;9(1):44-49.
- Thurmond MC, Hietala SK, Blanchard PC. Predictive values of fetal histopathology and immunoperoxidase staining in diagnosing bovine abortion caused by *Neospora caninum* in a dairy herd. *J. Vet Diagn Invest*. 1999;11(1):90-94.
- Tranas J, Heinzen RA, Weiss LM, McAllister MM. Serological evidence of human infection with the protozoan *Neospora caninum*. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1999;6(5):765-767.
- van Maanen C, Wouda W, Schares G, von Blumröder D, Conraths FJ, Norton R, Williams DJ, Esteban-Redondo I, Innes EA, Mattsson JG, Björkman C, Fernández-García A, Ortega-Mora LM, Müller N, Sager H, Hemphill A. An interlaboratory comparison of immunohistochemistry and PCR methods for detection of *Neospora caninum* in bovine foetal tissues. *Vet Parasitol*. 2004;126(4):351-364.
- Venturini MC, Venturini L, Bacigalupe D, Machuca M, Echaide I, Basso W, Unzaga JM, Di Lorenzo C, Guglielmone A, Jenkins MC, Dibey JP. *Neospora caninum* infection in bovine fetuses and dairy cows with abortions in Argentina. *Int. J. Parasitol.*, 1999;9:1705-1708.
- Vianna MC, Sreekumar C, Miska KB, Hill DE, Dubey JP. Isolation of *Neospora caninum* from naturally infected white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Vet Parasitol*. 2005;129(3-4):253-7.
- von Blumröder D, Schares G, Norton R, Williams DJ, Esteban-Redondo I, Wright S, Björkman C, Frössling J, Risco-Castillo V, Fernández-García A, Ortega-Mora LM, Sager H, Hemphill A, van Maanen C, Wouda W, Conraths FJ. Comparison and standardisation of serological methods for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in bovines. *Vet Parasitol*. 2004 120(1-2):11-22.
- Waldner CL, Janzen ED, Ribble CS. Determination of the association between *Neospora caninum* infection and reproductive performance in beef herds. *JAVMA*, 1998; 213:685-690.
- Waldner CL, Janzen ED, Henderson J, Haines D.M. Outbreak of abortion associated with *Neospora caninum* in a beef herd. *JAVMA*, 1999; 215 1485-1490.
- Wapenaar W, Jenkins MC, O'Handley RM, Barkema HW. *Neospora caninum*-like oocysts observed in feces of free-ranging red foxes (*Vulpes vulpes*) and coyotes (*Canis latrans*). *J Parasitol*. 2006 92(6):1270-1274.

- Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mossman TR. Bidirectional cytokines interactions in the materno foetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon?. /Immunol today/ 1993;* 14*: 353-356.
- Weiss LM, Ma YF, Halonen S, McAllister MM, Zhang YW. The in vitro development of *Neospora caninum* bradyzoites. Int J Parasitol. 1999;29(10):1713-1723.
- Williams DJ, Guy CS, McGarry JW, Guy F, Tasker L, Smith RF, MacEachern K, Cripps PJ, Kelly DF, Trees AJ. *Neospora caninum*-associated abortion in cattle: the time of experimentally-induced parasitaemia during gestation determines foetal survival.Parasitology. 2000;121(Pt 4):347-358.
- Williams DJ, Guy CS, Smith RF, Guy F, McGarry JW, McKay JS, Trees AJ. First demonstration of protective immunity against foetopathy in cattle with latent *Neospora caninum* infection. Int J Parasitol. 2003; 33(10):1059-1065.
- Wolfenson D, Lew BJ, Thatcher WW, Graber Y, Meidan R. Seasonal and acute heat stress effects on steroid production by dominant follicles in cows. Anim Reprod Sci. 1997; 47(1-2):9-19.
- Wouda W, Dubey JP, Jenkins MC. Serological diagnosis of bovine fetal neosporosis. J Parasitol., 1997;83:545-547.
- Wouda W, Brinkhof J, van Maanen C, de Gee ALW, Moen AR. Serodiagnosis of neosporosis in individual cows and dairy herds, a comparative study of three enzyme-linked immunosorbent assays. Clin. Diagn. Lab Immunol. 1998;5:711-716.
- Yamaga M, Flechtner O, Gottstein B. *Neospora caninum* specific oligonucleotide primers for the detection of brain "cyst" DNA of experimentally infected nude mice by the polymerase chain reaction (PCR). J. Parasitol. 1996; 82:272-279.
- Yaeger MJ, Shawd-Wessels S, Leslie-Steen P. *Neospora* abortion storm in a midwestern dairy. J Vet Diagn Invest. 1994;6(4):506-508.