

NEOSPOROSIS BOVINA: DINÁMICA DE LA INFECCIÓN Y PROPUESTAS DE CONTROL

Luis Miguel Ortega Mora, Pilar Horcajo, Javier Regidor Cerrillo,
Esther Collantes Fernández.

Grupo SALUVET. Dpto. de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria,
Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, España (saluvel@vet.ucm.es).

NEOSPORA CANINUM: EL AGENTE Y SU CICLO BIOLÓGICO

Neospora caninum es un protozoo formador de quistes tisulares perteneciente al phylum Apicomplexa. Desde que se describió por primera vez en 1989 como agente causal de aborto bovino en el estado de Nuevo Méjico en los EE.UU. (Thilsted and Dubey, 1989), este agente etiológico se ha convertido en una de las principales causas de fallo reproductivo de etiología transmisible en todo el mundo (Dubey et al., 2007). El ciclo biológico de *N. caninum* es heteroxeno facultativo. El perro, el coyote, el dingo y el lobo gris se han identificado como hospedadores definitivos (McAllister et al., 1998; Gondim et al., 2004; Dubey et al., 2011) pudiendo eliminar ooquistes con sus heces, que tras su esporulación en el ambiente actuarían como fase infectante para los hospedadores intermediarios. Hasta la fecha, se han identificado un amplio espectro de hospedadores intermediarios principalmente diversas especies de ungulados, incluida la especie bovina (Dubey et al., 2007). En el ganado bovino tienen lugar dos estadios diferentes del parásito: el taquizoito, que se multiplica rápidamente en diversos órganos del hospedador durante la fase aguda de la infección, teniendo como principales dianas los tejidos placentarios y fetales en animales gestantes, y el bradizoito que se multiplica lentamente en el interior de quistes tisulares localizados fundamentalmente en el Sistema Nervioso Central y en el tejido muscular, y que se asocia con la fase crónica de la infección.

PREVALENCIA E IMPORTANCIA ECONÓMICA DE LA NEOSPOROSIS BOVINA

La neosporosis bovina es una enfermedad de distribución mundial y con gran impacto económico debido al aborto que puede ocasionar. El ganado bovino infectado con el parásito tiene de tres a siete veces más

probabilidades de abortar en comparación con el ganado no infectado (Quintanilla-Gozalo et al., 2000; Dubey et al., 2007). Otros costes indirectos incluyen los gastos asociados al diagnóstico y el coste del reemplazo si las vacas abortadas son sacrificadas (Trees et al., 1999; Bartels et al., 2006b). Las seroprevalencias de la infección difieren considerablemente entre los países, las regiones y también entre el vacuno de carne y el lechero. Bartels et al. (2006a) en Europa han reportado seroprevalencias entre el 16-76% para el ganado lechero y el 41-61%. Recientemente, un estudio que incluyó a diez países señala que la seroprevalencia media está en un 16,1% (3,8-89,2%) en ganado lechero y en 11,5% (2,5-81,7%) en el ganado de carne. La estimación de pérdidas económicas causadas por la infección en estos 10 países asciende a unos 1.200 millones de dólares estadounidenses. Sin embargo, dada la distribución mundial de la enfermedad (se ha reportado la presencia de la infección en 45 países) las pérdidas económicas son, seguramente, considerablemente superiores a esta cifra (Reichel et al., 2013).

PRINCIPALES MODOS DE TRANSMISIÓN Y SUS CONSECUENCIAS

Desde hace más de una década se tiene un profundo conocimiento de la importancia de la transmisión vertical vía transplacentaria de *N. caninum* en el ganado bovino. Este modo de transmisión se produce cuando, en la hembra gestante, los taquizoitos atraviesan la placenta e invaden al feto (Dubey et al., 2007). Se sabe que las consecuencias de la infección en el feto dependen de factores tales como su edad e inmunocompetencia, la virulencia del aislado y la respuesta inmunitaria de la madre (Collantes-Fernández et al., 2006). En general, cuanto más tarde se produce la infección durante la gestación mayores son las probabilidades de que el ternero nazca sano aunque congénita-

mente infectado. La transmisión vertical es el modo de transmisión predominante y es altamente eficiente ya que muchas granjas mantienen una tasa de prevalencia más o menos constante a lo largo de los años con una correlación casi perfecta entre la seropositividad de las madres y sus terneros y sin que exista una aparente fuente externa de infección. Según su origen, la transmisión vertical puede ser endógena o exógena (EnTT y ExTT). La de origen endógeno ocurre cuando la madre ya presentaba una infección crónica y, como consecuencia de una recrudesencia de la misma durante la gestación, se produce el paso de los taquizoítos al feto. La transmisión endógena es pues presumiblemente la predominante en las granjas con un patrón de aborto endémico en las que la infección se mantiene de generación en generación. La transmisión vertical de origen exógeno, sin embargo, ocurre cuando la madre se infecta por primera vez con *N. caninum* durante la gestación transmitiéndolo al feto (Trees and Williams, 2005).

La transmisión vertical de *N. caninum* es tan eficiente que en muchas de estas granjas prácticamente la totalidad de los terneros nacidos de vacas infectadas nacen igualmente infectados pero clínicamente sanos (Dubey et al., 2007). En este tipo de explotaciones, el aborto por neosporosis suele ser un problema endémico registrándose de forma más o menos constante y espaciado durante largos periodos de tiempo. No obstante, aunque eficiente, la tasa de transmisión vertical no es del 100% y no explica por sí sola la epidemiología de la enfermedad en muchas granjas. En España se han detectado granjas con tasas de transmisión vertical del 40-50%, así como un porcentaje relativamente importante (13%) de vacas seropositivas nacidas de madres seronegativas (Pereira- Bueno et al., 2000) lo que indica la existencia de otra vía de transmisión además de la vertical transplacentaria.

El otro modo de transmisión en la neosporosis bovina es el horizontal o postnatal. Aunque su presentación es menos frecuente, puede dar lugar a unas repercusiones clínicas y económicas muy significativas. En la práctica, se produce por ingestión por parte del ganado de los ooquistes que son eliminados por los perros y que contaminan el alimento o el agua (Dubey et al., 2007). Generalmente, cuando aparece esta contaminación externa y, por consiguiente, la transmisión horizontal al ganado, una proporción elevada del

rebaño se infecta por primera vez en muy poco tiempo y, con frecuencia, se traduce en un brote de abortos como consecuencia de la transmisión vertical exógena al feto (patrón de aborto epidémico). Muchos autores han descrito diversos casos de granjas con patrón de aborto epidémico por neosporosis en diferentes países (Schares et al., 2002; Sager et al., 2005). En España, en los últimos años, nuestro grupo de investigación ha estudiado varias explotaciones que han sufrido brotes epidémicos. Éste hecho unido a la alta seroprevalencia encontrada en perros de granja (51%) (Collantes-Fernández et al., 2008) pone de relieve la relevancia de la transmisión horizontal a la hora de establecer las medidas de control. Existen otras posibles fuentes de infección relacionadas con cánidos silvestres y hospedadores intermediarios silvestres tales como roedores que podrían actuar como reservorio, aunque su importancia epidemiológica está aún por determinar (Gondim, 2006).

DINÁMICA DE LA INFECCIÓN EN EL GANADO VACUNO

Los factores que influyen en la dinámica de la infección de *N. caninum* en bovinos, como la transmisión postnatal *vs. in utero* y el estado inmunológico tanto de la madre como del feto, son variables importantes que deben tenerse en cuenta. Además, las características específicas del parásito (por ejemplo, el estadio parasitario y la variación intra-específica de la virulencia) también tienen implicaciones importantes para el desarrollo de la respuesta inmunitaria en el hospedador (Figura 1).

Transmisión postnatal vs. intrauterina. El contexto del estímulo inicial del sistema inmunitario por el parásito es una cuestión fundamental. Puede haber diferencias notables en las consecuencias clínicas, dependiendo de si la infección tiene lugar en el útero antes del nacimiento, o si se produce una infección postnatal. Por el momento, muy pocos estudios se han centrado en la infección natural postnatal. Los resultados son similares a los descritos en los estudios experimentales. La infección de las madres durante la gestación a través de la ExTT resulta en aborto o terneros infectados, pero estas madres infectadas no transmitieron, o lo hicieron en raras ocasiones la infección a su progenie en sucesivas gestaciones (Bartels et al., 2007; Dijkstra et al., 2008). Por otro lado, los animales infectados con *N. caninum*

antes de la gestación dan lugar a terneros seronegativos sin evidencia de infección por *N. caninum* (Williams et al., 2000; Innes et al., 2001; Pereira et al., 2004). Estos resultados sugieren que los animales infectados posnatalmente pueden eliminar la infección y desarrollar inmunidad que protege contra el aborto o la transmisión a generaciones sucesivas. Por otra parte, los animales infectados en el útero por EnTT permanecen infectados persistentemente y pueden experimentar recrudescencia y abortar o transmitir la infección a la progenie en gestaciones sucesivas (Barr et al., 1993; Anderson et al., 1995; Thurmond and Hietala, 1997; Wouda et al., 1998). Sin embargo, el riesgo de aborto disminuye en las gestaciones posteriores y, por lo tanto, parece que los animales persistentemente infectados desarrollan cierto grado de inmunidad (Thurmond and Hietala, 1997; Romero et al., 2002; Dijkstra et al., 2003). Todos estos resultados en conjunto sugieren que el ganado vacuno puede desarrollar inmunidad protectora frente a este parásito y, por lo tanto, puede ser apropiada una estrategia de control basada en la vacunación. Sin embargo, hasta el momento sólo hay pruebas de protección inmunitaria frente a la ExTT. En un estudio de campo, las vacas con infección previa con *N. caninum* tuvieron menos probabilidades de abortar o dar a luz prematuramente durante un brote de neosporosis que las que sufren una infección primaria (McAllister et al., 2000). Williams et al. (2003) demostraron en animales naturalmente infectados que en madres infectadas crónicamente la respuesta inmunitaria protege frente a un desafío exógeno pero es ineficaz frente a la reactivación de la infección supuestamente adquirida *in utero*. Una protección similar frente a la ExTT se observa en las madres infectadas con taquizoítos de *N. caninum* antes de la gestación y desafiadas a mediados de la gestación (Innes et al., 2001). Estos hallazgos también tienen implicaciones importantes para el desarrollo de las vacunas. Si bien, la protección frente a la ExTT es factible, la protección frente a la EnTT no se ha demostrado hasta el momento, por lo tanto, la eficacia de cualquier candidato vacunal debe evaluarse en modelos adecuados para ambos modos de transmisión.

El sistema inmunológico en la madre. Por el momento, los mecanismos responsables de la muerte fetal no se conocen en su totalidad, pero el conocimiento sobre las variaciones de la respuesta inmunitaria en la

madre durante la gestación podría ayudar a entender el resultado final del proceso. Clásicamente, el paradigma de la modulación inmunológica en la vaca durante la gestación se ha basado en el equilibrio Th1 / Th2 y en la importancia de un sesgo hacia una respuesta inmunitaria de tipo Th2 a partir del segundo tercio de la gestación (Wegmann et al., 1993). Los nuevos estudios han ampliado esta regulación clásica con el paradigma Th1 / Th2 / Th17 y Treg, en el que la regulación por la hormona progesterona juega un papel importante (Saito et al., 2010; Schumacher et al., 2014). En el ganado bovino gestante, los niveles de progesterona aumentan de manera constante desde el inicio hasta la mitad de la gestación (Pope et al., 1969). Los estudios en estos animales han demostrado que la progesterona inhibe la expresión de citoquinas proinflamatorias IFN- γ e IL-17, pero aumenta la expresión de IL-4 (Ohtsuka et al., 2009; Maeda et al., 2013). En contraste con los estudios en humanos y ratones, los efectos de la progesterona en las células Treg no se han demostrado (Maeda et al., 2013). Podemos concluir que una inmunidad con sesgo de Th2 es una característica en la vaca preñada.

El conocimiento de la respuesta inmunitaria protectora frente a *N. caninum* en bovinos sigue siendo muy limitado, pero, de forma similar a lo que acontece con otros patógenos intracelulares, la respuesta inmunitaria mediada por células, basadas en una respuesta celular de tipo T CD4 + y citoquinas proinflamatorias como IFN- γ , podrían desempeñar un papel importante en la protección frente a la infección (Lunden et al., 1998; Marks et al., 1998; De Marez et al., 1999; Andrianarivo et al., 2001; Bartley et al., 2004; Rosbottom et al., 2007). Poco se sabe sobre los mecanismos que causan la recrudescencia (o la conversión de bradizoito a taquizoíto) en *N. caninum*. Sin embargo, en *Toxoplasma gondii* la conversión de los bradizoítos a taquizoítos se produce por el deterioro de la respuesta Th1 (Luft et al., 1984). Una situación similar podría ocurrir en bovinos gestantes, ya que la inmunomodulación natural hacia una respuesta Th2 podría comprometer la capacidad de controlar la multiplicación de *N. caninum* (Innes et al., 2002).

Además de la respuesta inmunitaria sistémica, la expresión de citoquinas Th2 (IL-4) y reguladoras (IL-10 y TGF- β) en la interfase materno-fetal es crucial para el mantenimiento de la gestación y para evitar el rechazo del

feto (Entrican, 2002). La infección por *N. caninum* desencadena una respuesta proinflamatoria que, aunque necesaria para proteger a la infección, rompe el equilibrio en la interfase materno-fetal y puede ser causa de aborto (Almería et al., 2003; Maley et al., 2006; Rosbottom et al., 2008; Almería et al., 2011; Regidor-Cerrillo et al., 2014).

El sistema inmunológico en el feto. El resultado de la infección por *N. caninum* depende en gran medida del momento de la gestación en que esta ocurre y está en relación con el desarrollo de la inmunocompetencia fetal (Innes et al., 2002). En el primer trimestre de gestación el sistema inmunitario fetal apenas está comenzando a desarrollarse, aunque algunos linfocitos son evidentes en el timo a partir de los 42 días de gestación (Barrington, 2001). En esta etapa, las consecuencias de la infección por *N. caninum* son más graves e incluyen la muerte y la reabsorción, la autólisis o la momificación del feto (Williams et al., 2000; Collantes-Fernández et al., 2006; Gibney et al., 2008; Rosbottom et al., 2008; Regidor-Cerrillo et al., 2014). La capacidad del feto para desarrollar una respuesta inmunitaria frente a cualquier patógeno invasor aumenta progresivamente con el tiempo a medida que el sistema inmunitario se desarrolla en función del estímulo antigénico concreto (Barrington, 2001). Se ha demostrado que los tejidos linfoides periféricos de los fetos infectados maduran y producen inmunoglobulinas antes que aquellos que no están infectados a la misma edad gestacional (Schultz et al., 1973). Los fetos de vacas infectadas experimentalmente son capaces de inducir respuestas inmunitarias celulares y humorales detectables frente a la infección por *N. caninum* a partir de los 3-4 meses de gestación (Trees et al., 2002; Almería et al., 2003; Bartley et al., 2012; Regidor-Cerrillo et al., 2014). El desarrollo y la maduración de los componentes celulares de la respuesta inmunitaria adquirida se producen, principalmente, durante este período de la gestación. El resultado de la infección a mediados de la gestación es variable. Puede ocurrir el nacimiento de terneros sanos pero congénitamente infectados, pero la muerte del concepto es más probable, ya que en casos naturales la mayoría de los abortos debidos a infección por *N. caninum* se reportan en esta etapa (Dubey et al., 2007; Almería and López-Gatius, 2013). De hecho, la respuesta inmunitaria innata mediada por las células fagocíticas no se desarrolla completamente hasta la gestación tardía, y algunos componentes tales como el

complemento o el interferón están presentes sólo a niveles bajos. Las infecciones durante la gestación tardía suelen asociarse con el nacimiento de terneros sanos pero congénitamente infectados (Williams et al., 2000; Collantes-Fernández et al., 2006; Dubey et al., 2006) que serán capaces de transmitir el parásito en gestaciones sucesivas.

Estadio del parásito y variabilidad biológica intraespecífica. Dos etapas diferentes del ciclo biológico están presentes en las interacciones de *N. caninum* con el ganado vacuno. Los taquizoitos invaden la célula hospedadora eficientemente, se multiplican y se diseminan rápidamente, lo que permite que los parásitos atraviesen la placenta y lleguen a los tejidos fetales, provocando el aborto (Dubey & Schares, 2011). Aunque los mecanismos no se conocen completamente, se cree que bajo la presión de la respuesta inmunitaria del hospedador los taquizoitos se diferencian en bradizoitos. Éstos exhiben una cinética de proliferación más lenta, diferentes parámetros metabólicos y forman quistes tisulares que los protegen de la reacción inmunitaria. La formación de quistes tisulares, junto con la expresión de diferentes patrones de antígenos, y la localización de quistes en el Sistema Nervioso Central (con inmunidad privilegiada), facilitan la evasión de la respuesta inmunitaria (Dubey & Lindsay, 1996). La inmunidad se dirigirá principalmente frente a aquellos parásitos que son accesibles, por lo que se dirigirá principalmente a eliminar los taquizoitos que proliferan rápidamente.

Los esporozoítos que se encuentran en el interior de los ooquistes esporulados son el estadio del parásito que puede infectar al ganado horizontalmente. Sólo existe información limitada sobre infecciones experimentales con ooquistes y las características de la respuesta inmunitaria específica en las mucosas son poco conocidas (De Marez et al., 1999; Trees et al., 2002; McCann et al., 2007).

Otro factor que debe tenerse en cuenta es la variabilidad genética y fenotípica de los diferentes aislados de *N. caninum*. Aunque se sabe poco sobre la estructura genética de sus poblaciones, se han demostrado claras diferencias en la patogenicidad y virulencia entre los aislados en las infecciones experimentales en bovinos. Mientras que algunos aislamientos se definen como de baja virulencia (Nc-Spain1H o Nc-Bahia), debido a su

baja capacidad para inducir daño fetal, otros aislados se consideran de virulencia moderada (Nc-1) o alta virulencia (Nc-Spain7 o Nc-Liv), debido a que la infección con estos aislados producen mayores tasas de mortalidad fetal después de la infección en las madres durante la gestación (Rojo-Montejo et al., 2009; Caspe et al., 2012; Chryssafidis et al., 2014; Regidor-Cerrillo et al., 2014).

CONTROL DE LA NEOSPOROSIS BOVINA

Como se ha expuesto anteriormente, la situación epidemiológica de la neosporosis bovina es variable según el país, la región e incluso la granja y por tanto, es difícil recomendar una estrategia general para su control. La elección de las medidas de control está en función de la magnitud de la enfermedad y de sus características en la explotación y, por tanto, de los objetivos que se deseen alcanzar, ya sean la reducción de la prevalencia de la infección en las explotaciones con brotes declarados o la prevención de su propagación evitando tanto la transmisión horizontal como la vertical. Los diferentes programas de control deberían desarrollarse "a medida" para cada explotación, incorporando un análisis coste-beneficio teniendo en cuenta los costes que supone la determinación de la magnitud del problema y la puesta en marcha de las medidas de control frente al beneficio de reducir las pérdidas económicas que ocasiona la enfermedad. En este sentido, el apoyo de un laboratorio de referencia que, disponiendo de una amplia batería de técnicas laboratoriales, lleve a cabo un abordaje global del diagnóstico, juega un papel fundamental a la hora de diseñar un programa de control de la neosporosis.

En resumen, el punto de partida en el diseño de un programa de control de la neosporosis es conocer la situación inicial de la granja sobre el grado de diseminación de la infección o la implicación de la enfermedad en los abortos. Los pasos a seguir serían los siguientes (Figura 2):

1. Estado inicial de la enfermedad en la granja: el diagnóstico como herramienta para el control

Un diagnóstico correcto y completo no sólo debe incluir el conocimiento de la prevalencia de la infección y su implicación en el aborto, sino también el modo predominante de transmisión puesto que de ello dependen

las consecuencias clínicas y económicas de la infección y, por tanto, las medidas de control a adoptar en cada caso. En la práctica, el diagnóstico se debe abordar desde un punto de vista colectivo. Las técnicas serológicas convencionales (ELISA e IFI) (Atkinson et al., 2000; Rebordosa et al., 2000) para la detección de anticuerpos específicos frente a *N. caninum* en muestras de suero son la herramienta de elección para conocer la situación inicial de la granja. La seroprevalencia en la granja y la seroprevalencia en las vacas abortadas nos indicarán la magnitud del problema y si éste es debido a la infección por *N. caninum*. Además la relación entre la serología materna y la de su descendencia, así como la distribución de los animales seropositivos por edades nos orientará sobre el modo de transmisión predominante en esa granja. La detección de anticuerpos en muestras de leche mediante ELISA es una herramienta igualmente factible con resultados equiparables a los de suero con las ventajas añadidas de menores costes y manejo del animal (Chanlun et al., 2002; Schares et al., 2003; Salas-Calvo et al., 2005). Sin embargo, debido al efecto de dilución de los anticuerpos en el tanque, únicamente es útil en rebaños con prevalencias intra-rebaño superiores al 10-15%. Por esta razón, el uso de esta técnica se recomienda en la fase de seguimiento del programa de control y no tanto para conocer el estado serológico inicial de la granja. Este primer abordaje serológico, sobre todo en los casos de aparición de brotes inesperados de abortos, se debe acompañar de la aplicación de técnicas de detección del parásito en los tejidos de fetos abortados (cerebro, placenta y corazón principalmente), mediante la técnica de PCR y junto con la determinación de la existencia de lesiones compatibles en dichos tejidos. En este punto, el envío del feto o muestras fetales al laboratorio de forma rápida y adecuada es fundamental para mantener las muestras en buenas condiciones.

Una vez confirmadas la infección por *N. caninum* y la situación serológica de la granja, la herramienta diagnóstica de elección es el ELISA de avidéz (Aguado-Martínez et al., 2005). Esta técnica permite detectar los anticuerpos de baja afinidad que aparecen en las fases iniciales de la infección. Este hecho permite discriminar entre explotaciones en las que gran parte de los animales presentan una infección reciente como causa de la transmisión horizontal, de aquellas en las que sus animales están crónicamente

infectados. No obstante, el ELISA de avidéz presenta una serie de inconvenientes como son el corto periodo de tiempo en el que es capaz de detectar una primo-infección, pudiendo algunas granjas pasar desapercibidas, y la incapacidad de diferenciar una recrudescencia de una infección crónica.

2. Puesta en marcha del programa de control

Una vez conocida la situación epidemiológica de la granja pasaremos a decidir que medidas son las más apropiadas. En la Figura 2 se detalla esquemáticamente los pasos a seguir para el control de la infección por *N. caninum* en las explotaciones bovinas. A continuación se describen brevemente las diferentes opciones de control de las que disponemos en la actualidad así como las nuevas alternativas que podrían utilizarse en un futuro.

a. Control en explotaciones no infectadas. El principal objetivo en estas granjas es prevenir la entrada de la infección mediante las siguientes medidas de bioseguridad y manejo: (a) seguimiento serológico de los animales con el fin de detectar nuevos casos y eliminarlos, (b) política de adquisición y reposición con animales que presenten diagnóstico negativo y (c) control de la transmisión horizontal, adoptando las medidas para evitar la infección postnatal que describiremos posteriormente.

b. Control de la transmisión vertical en explotaciones infectadas. Debido a la importancia de la transmisión vertical en el mantenimiento de la infección dentro de un rebaño las medidas encaminadas a evitarla deben constituir la base del control de esta enfermedad.

Medidas de bioseguridad. Para evitar la entrada de nuevos casos es sumamente importante realizar un control sobre la reposición, que engloba: (a) adquisición de animales libres de la infección y (b) diagnóstico de todas las hembras nacidas en la explotación que vayan a formar parte de la reposición, seleccionando para la renovación sólo aquellos animales libres de la infección. Por otro lado, sería recomendable la prevención de potenciales factores que pudieran alterar el balance inmunológico durante la gestación favoreciendo una recrudescencia en vacas congénitamente infectadas.

Manejo de la reproducción. La transferencia

de embriones de hembras infectadas a no infectadas, sobre todo en el caso de reproductoras de alto valor genético (Baillargeon et al., 2001), se propone con el objetivo de reducir el riesgo de transmisión transplacentaria endógena.

Diagnóstico y sacrificio selectivo. En la actualidad, el seguimiento del estado serológico de las reproductoras, evitando la presencia de hembras seropositivas en la granja es la medida más eficaz de prevención de la neosporosis (Thurmond and Hietala, 1995; French et al., 1999; Jensen et al., 1999). Existen diversas estrategias de eliminación de los animales seropositivos que, en combinación, con otras medidas van encaminadas a la reducción/eliminación de la infección en las explotaciones. La selección de una estrategia u otra depende de la seroprevalencia en la granja y su instauración puede hacerse de dos formas: drásticamente, eliminando todas las vacas seropositivas, o gradualmente. Si la seroprevalencia es baja puede ser factible la eliminación gradual de las vacas positivas pero si ésta es elevada es muy probable que la eliminación de los animales seropositivos no sea una medida realista económicamente y debemos actuar siguiendo pautas más moderadas. En esta estrategia cabe destacar las siguientes opciones: (a) la eliminación de vacas seropositivas o seropositivas con antecedentes de aborto, (b) inseminación de la progenie de vacas seropositivas con semen de toros de aptitud cárnica y (c) evitar la reposición con crías de hembras seropositivas.

c. Control de la transmisión horizontal en explotaciones infectadas

Entre las medidas específicas que podrían contemplarse para el control de la transmisión horizontal se encontrarían las siguientes:

Prevenir la transmisión de perros y otros potenciales hospedadores definitivos, evitando en la medida de lo posible el acceso de estos al pasto y pienso.

Eliminación segura de tejidos fetales y placentarios. Con el fin de disminuir el riesgo de infección en el hospedador definitivo, los fetos abortados, placentas y otros tejidos bovinos deben ser eliminados de forma segura lo más rápidamente posible.

Prevenir la transmisión hídrica, evitando la contaminación con heces de hospedadores definitivos.

Control de roedores. Aunque se desconoce su implicación en la epidemiología del parásito, los roedores podrían constituir un reservorio de la infección, por ello, se deberían aplicar medidas regulares de control de los roedores en las explotaciones bovinas.

VACUNACIÓN

La vacunación es la principal alternativa de futuro en el control de la neosporosis (Reichel and Ellis, 2006), fundamentalmente en aquellas explotaciones con prevalencias altas. En la actualidad, el desarrollo de vacunas frente a la neosporosis es un campo en el que se está trabajando intensamente. En este sentido, existen ciertos puntos que deberían contemplarse a la hora de diseñar una vacuna frente a *N. caninum*: (a) objetivo de la vacuna, si esta pretende proteger frente al aborto o frente a la transmisión vertical, (b) eficacia de la vacuna tanto en ensayos experimentales como en pruebas de campo, (c) seguridad de la vacuna y (d) posibilidad de diferenciación entre animales vacunados e infectados mediante el empleo de una técnica diagnóstica sencilla.

La única vacuna frente a *N. caninum* que ha estado disponible en el mercado y que actualmente se ha retirado por falta de eficacia era inactivada. Esta vacuna -NeoGuard- no confería protección frente al aborto en vacas gestantes infectadas experimentalmente con el parásito (Andrianarivo et al., 2000) y en varios estudios de campo también presentó una eficacia baja (5,2%-54%) (Romero et al., 2004; Weston et al., 2012). Por otro lado, el empleo de vacunas vivas atenuadas ha mostrado resultados prometedores de protección frente al aborto en infecciones experimentales en ganado bovino (Williams et al., 2007; Mazuz et al., 2015). Sin embargo, ninguna vacuna viva ha llegado al mercado probablemente debido a desventajas inherentes como la preservación y seguridad del parásito, incluido el riesgo de reversión a la patogenicidad (Reichel et al., 2015). Las vacunas subunitarias y las vacunas inactivadas constituyen otros enfoques atractivos, pero hasta ahora sólo han mostrado una eficacia limitada. El desarrollo de vacunas de subunidades frente a *N. caninum* se ve dificultado por limitaciones claras en nuestra comprensión actual de la naturaleza, desarrollo y mantenimiento de la respuesta inmunitaria protectora. Para la selección de antígenos adecuados son importantes algunas características tales como su implicación en una

actividad funcional esencial del parásito, su inmunogenicidad y su accesibilidad para interaccionar con las células inmunitarias. Además, *N. caninum* es capaz de modular la célula hospedadora lo que tiene un impacto en la respuesta inmunitaria de la vaca y en el desarrollo de la enfermedad. El conocimiento de la respuesta inmunitaria eficaz y la comprensión de los mecanismos parasitarios que las ocasionan proporcionarán, en un futuro, información importante que puede incorporarse a los desarrollos vacunales. De esta manera, la aplicación de las tecnologías ómicas puede ser muy útil para describir los elementos desconocidos en estos procesos. El conocimiento que se ha generado sobre la alta variabilidad biológica de diferentes aislados de *N. caninum* representa una excelente herramienta para la identificación de nuevas vacunas. Las diferencias entre los aislados de alta y baja virulencia a diferentes niveles (genómico, transcriptómico y proteómico), detectados en modelos *in vitro* e *in vivo*, podrían ser utilizados para definir los factores clave de virulencia de *N. caninum*, que podrían representar excelentes objetivos para el desarrollo vacunal. Por último, la aplicación de tecnologías innovadoras (vectores vacunales actuales e innovadores e inmunomoduladores, vacunas DIVA, coadyuvantes eficientes) en modelos animales experimentales armonizados acelerarán el desarrollo de una vacuna eficaz frente a esta importante enfermedad de los bovinos.

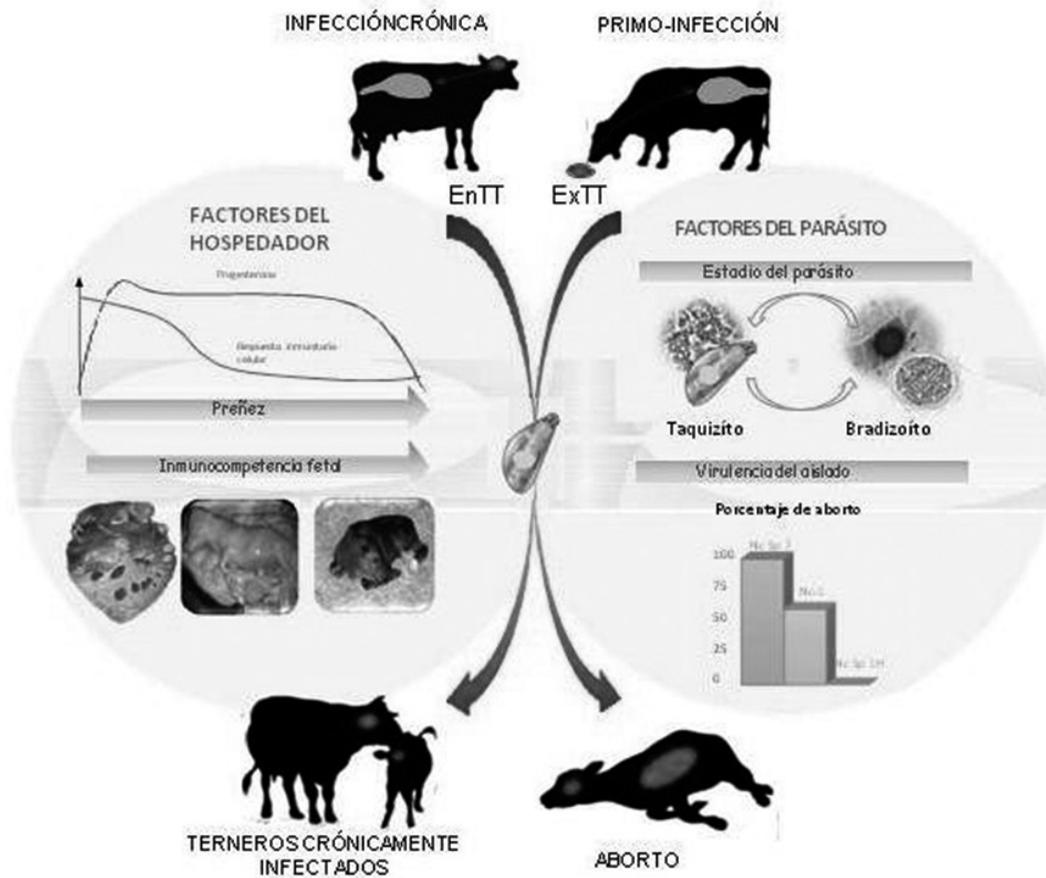


Figura 1. Factores con influencia en la dinámica de la infección por *N. caninum*.

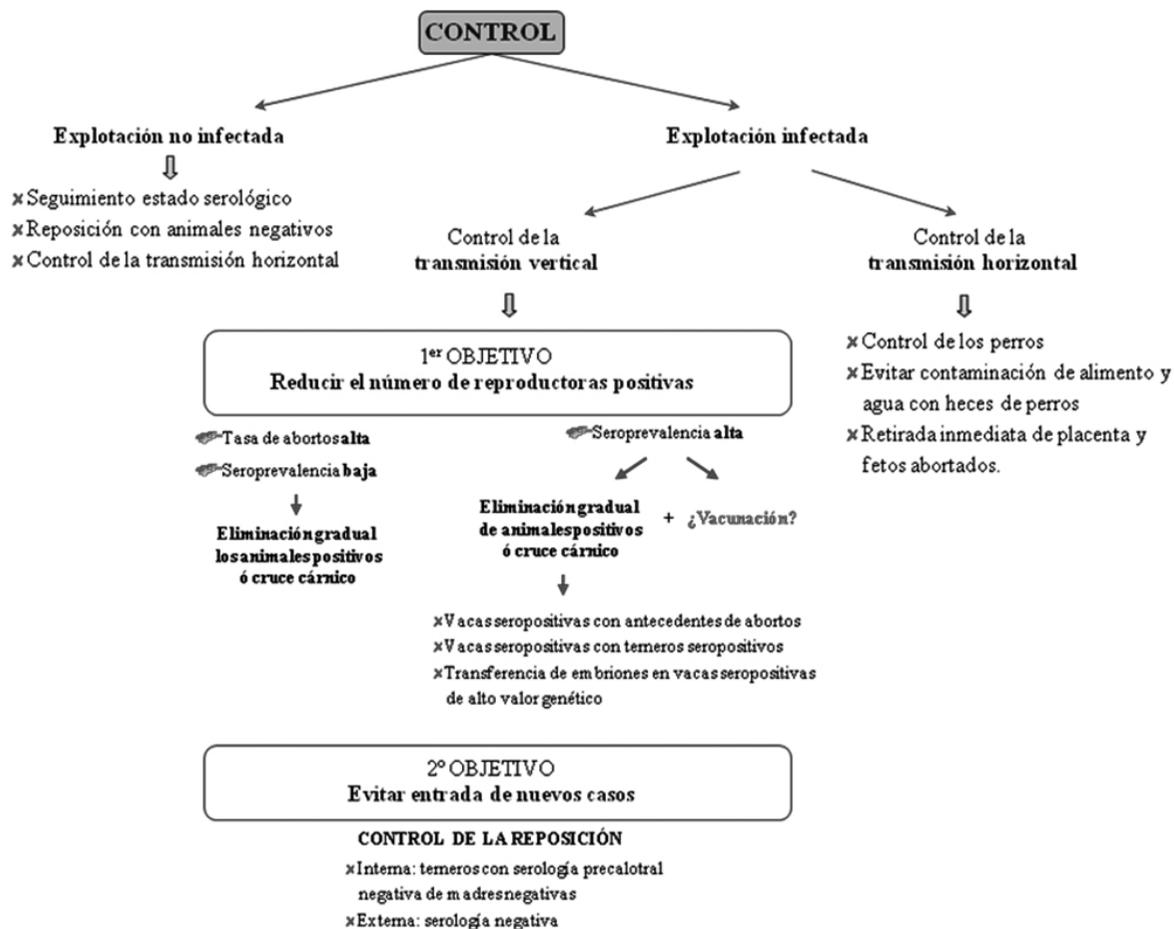


Figura 2. Medidas de control de la neosporosis bovina.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguado-Martínez, A., Álvarez-García, G., Arnaiz-Seco, I., Innes, E., Ortega-Mora, L.M., 2005. Use of avidity enzyme-linked immunosorbent assay and avidity Western blot to discriminate between acute and chronic *Neospora caninum* infection in cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.* 17 (5), 442-450.
- Almería, S., Araujo, R.N., Darwich, L., Dubey, J.P., Gasbarre, L.C., 2011. Cytokine gene expression at the materno-foetal interface after experimental *Neospora caninum* infection of heifers at 110 days of gestation. *Parasite Immunol.* 33 (9), 517-523.
- Almería, S., De Marez, T., Dawson, H., Araujo, R., Dubey, J.P., Gasbarre, L.C., 2003. Cytokine gene expression in dams and fetuses after experimental *Neospora caninum* infection of heifers at 110 days of gestation. *Parasite Immunol.* 25 (7), 383-392.
- Almería, S., López-Gatius, F., 2013. Bovine neosporosis: Clinical and practical aspects. *Res. Vet. Sci.* 95 (2), 303-309.
- Anderson, M.L., Palmer, C.W., Thurmond, M.C., Picanso, J.P., Blanchard, P.C., Breitmeyer, R.E., Layton, A.W., McAllister, M., Daft, B., Kinde, H., 1995. Evaluation of abortions in cattle attributable to neosporosis in selected dairy herds in California. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 207 (9), 1206-1210.
- Andrianarivo, A.G., Barr, B.C., Anderson, M.L., Rowe, J.D., Packham, A.E., Sverlow, K.W., Conrad, P.A., 2001. Immune responses in pregnant cattle and bovine fetuses following experimental infection with *Neospora caninum*. *Parasitol. Res.* 87 (10), 817-825.
- Andrianarivo, A.G., Rowe, J.D., Barr, B.C., Anderson, M.L., Packham, A.E., Sverlow, K.W., Choromanski, L., Loui, C., Grace, A., Conrad, P.A., 2000. A POLYGEN-adjuvanted killed *Neospora caninum* tachyzoite preparation failed to prevent foetal infection in pregnant cattle following i.v./i.m. experimental tachyzoite challenge. *Int. J. Parasitol.* 30 (9), 985-990.
- Atkinson, R., Harper, P.A., Reichel, M.P., Ellis, J.T., 2000. Progress in the serodiagnosis of *Neospora caninum* infections of cattle. *Parasitol. Today* 16 (3), 110-114.
- Baillargeon, P., Fecteau, G., Pare, J., Lamothe, P., Sauve, R., 2001. Evaluation of the embryo transfer procedure proposed by the International Embryo Transfer Society as a method of controlling vertical transmission of *Neospora caninum* in cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 218 (11), 1803-1806.
- Barr, B.C., Conrad, P.A., Breitmeyer, R., Sverlow, K., Anderson, M.L., Reynolds, J., Chauvet, A.E., Dubey, J.P., Ardans, A.A., 1993. Congenital *Neospora* infection in calves born from cows that had previously aborted *Neospora*-infected fetuses: four cases (1990-1992). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 202 (1), 113-117.
- Barrington GM, P.S., 2001. Bovine neonatal immunology. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.* 17(3), 463-476.
- Bartels, C.J., Arnaiz-Seco, J.I., Ruiz-Santa-Quitera, A., Bjorkman, C., Frossling, J., von, B.D., Conraths, F.J., Schares, G., van, M.C., Wouda, W., Ortega-Mora, L.M., 2006. Supranational comparison of *Neospora caninum* seroprevalences in cattle in Germany, The Netherlands, Spain and Sweden. *Vet. Parasitol.* 137 (1-2), 17-27.
- Bartels, C.J., Huinink, I., Beiboer, M.L., van, S.G., Wouda, W., Dijkstra, T., Stegeman, A., 2007. Quantification of vertical and horizontal transmission of *Neospora caninum* infection in Dutch dairy herds. *Vet. Parasitol.* 148 (2), 83-92.
- Bartels, C.J., van, S.G., Veldhuisen, J.P., van, d.B., Wouda, W., Dijkstra, T., 2006. Effect of *Neospora caninum*-serostatus on culling, reproductive performance and milk production in Dutch dairy herds with and without a history of *Neospora caninum*-associated abortion epidemics. *Prev. Vet. Med.* 77 (3-4), 186-198.
- Bartley PM, M., Wright SE, M., Maley SW, D., Macaldowie CN, D., Nath, M.D., Hamilton CM, D., Katzer, F.D., Buxton, D.D., Innes EA, P., 2012. Maternal and foetal immune responses of cattle following an experimental challenge with *Neospora caninum* at day 70 of gestation. *Vet. Res.* 43 (1), 38.
- Bartley, P.M., Kirvar, E., Wright, S., Swales, C., Esteban-Redondo, I., Buxton, D., Maley, S.W., Schock, A., Rae, A.G., Hamilton, C., Innes, E.A., 2004. Maternal and fetal immune responses of cattle inoculated with *Neospora caninum* at mid-gestation. *J. Comp. Pathol.* 130 (2-3), 81-91.
- Caspe, S.G., Moore, D.P., Leunda, M.R., Cano, D.B., Lischinsky, L., Regidor-Cerrillo, J., Álvarez-García, G., Echaide, I.G., Bacigalupe, D., Ortega-Mora, L.M., Odeon, A.C., Campero, C.M., 2012. The *Neospora caninum*-Spain 7 isolate induces placental damage, fetal death and abortion in cattle when inoculated in early gestation. *Vet. Parasitol.* 189 (2-4), 171-181.
- Chanlun, A., Naslund, K., Aiumlamai, S., Bjorkman, C., 2002. Use of bulk milk for detection of *Neospora caninum* infection in dairy herds in Thailand. *Vet. Parasitol.* 110 (1-2), 35-44.

- Chryssafidis, A.L., Canton, G., Chianini, F., Innes, E.A., Madureira, E.H., Gennari, S.M., 2014. Pathogenicity of Nc-Bahia and Nc-1 strains of *Neospora caninum* in experimentally infected cows and buffaloes in early pregnancy. *Parasitol. Res.* 113 (4), 1521-1528.
- Collantes-Fernández, E., Gómez-Bautista, M., Miró, G., Álvarez-García, G., Pereira-Bueno, J., Frisuelos, C., Ortega-Mora, L.M., 2008. Seroprevalence and risk factors associated with *Neospora caninum* infection in different dog populations in Spain. *Vet. Parasitol.* 152 (1-2), 148-151.
- Collantes-Fernández, E., Rodríguez-Bertos, A., Arnaiz-Seco, I., Moreno, B., Aduriz, G., Ortega-Mora, L.M., 2006. Influence of the stage of pregnancy on *Neospora caninum* distribution, parasite loads and lesions in aborted bovine foetuses. *Theriogenology* 65 (3), 629-641.
- De Marez, T., Liddell, S., Dubey, J.P., Jenkins, M.C., Gasbarre, L., 1999. Oral infection of calves with *Neospora caninum* oocysts from dogs: humoral and cellular immune responses. *Int. J. Parasitol.* 29 (10), 1647-1657.
- Dijkstra, T., Barkema, H.W., Eysker, M., Beiboer, M.L., Wouda, W., 2003. Evaluation of a single serological screening of dairy herds for *Neospora caninum* antibodies. *Vet. Parasitol.* 110 (3-4), 161-169.
- Dijkstra, T., Lam, T.J., Bartels, C.J., Eysker, M., Wouda, W., 2008. Natural postnatal *Neospora caninum* infection in cattle can persist and lead to endogenous transplacental infection. *Vet. Parasitol.* 152 (3-4), 220-225.
- Dubey, J., Schares, G., 2011. Neosporosis in animals—the last five years. *Vet. Parasitol.* 180 (1), 90-108.
- Dubey, J.P., Buxton, D., Wouda, W., 2006. Pathogenesis of bovine neosporosis. *J. Comp. Pathol.* 134 (4), 267-289.
- Dubey, J.P., Jenkins, M.C., Rajendran, C., Miska, K., Ferreira, L.R., Martins, J., Kwok, O.C.H., Choudhary, S., 2011. Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for *Neospora caninum*. *Vet. Parasitol.* 181 (2-4), 382-387.
- Dubey, J.P., Lindsay, D.S., 1996. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Vet. Parasitol.* 67 (1-2), 1-59.
- Dubey, J.P., Schares, G., Ortega-Mora, L.M., 2007. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. *Clin. Microbiol. Rev.* 20 (2), 323-367.
- Entrican, G., 2002. Immune regulation during pregnancy and host-pathogen interactions in infectious abortion. *J. Comp. Pathol.* 126 (2-3), 79-94.
- French, N.P., Clancy, D., Davison, H.C., Trees, A.J., 1999. Mathematical models of *Neospora caninum* infection in dairy cattle: transmission and options for control. *Int. J. Parasitol.* 29 (10), 1691-1704.
- Gibney, E.H., Kipar, A., Rosbottom, A., Guy, C.S., Smith, R.F., Hetzel, U., Trees, A.J., Williams, D.J., 2008. The extent of parasite-associated necrosis in the placenta and foetal tissues of cattle following *Neospora caninum* infection in early and late gestation correlates with foetal death. *Int. J. Parasitol.* 38 (5), 579-588.
- Gondim, L.F., McAllister, M.M., Pitt, W.C., Zemlicka, D.E., 2004. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* 34 (2), 159-161.
- Gondim, L.F.P., 2006. *Neospora caninum* in wildlife. *Trends Parasitol.* 22 (6), 247-252.
- Innes, E.A., Andrianarivo, A.G., Bjorkman, C., Williams, D.J., Conrad, P.A., 2002. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. *Trends Parasitol.* 18 (11), 497-504.
- Innes, E.A., Wright, S.E., Maley, S., Rae, A., Schock, A., Kirvar, E., Bartley, P., Hamilton, C., Carey, I.M., Buxton, D., 2001. Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. *Int. J. Parasitol.* 31 (13), 1523-1534.
- Jensen, A.M., Bjorkman, C., Kjeldsen, A.M., Wedderkopp, A., Willadsen, C., Uggla, A., Lind, P., 1999. Associations of *Neospora caninum* seropositivity with gestation number and pregnancy outcome in Danish dairy herds. *Prev. Vet. Med.* 40 (3-4), 151-163.
- Luft BJ, Brooks RG, Conley FK, McCabe RE, Remington JS, 1984. Toxoplasmic encephalitis in patients with acquired immune deficiency syndrome. *JAMA* 252 (7), 913-917.
- Lunden, A., Marks, J., Maley, S.W., Innes, E.A., 1998. Cellular immune responses in cattle experimentally infected with *Neospora caninum*. *Parasite Immunol.* 20 (11), 519-526.
- Maeda, Y., Ohtsuka, H., Tomioka, M., Oikawa, M., 2013. Effect of progesterone on Th1/Th2/Th17 and regulatory T cell-related genes in peripheral blood mononuclear cells during pregnancy in cows. *Vet. Res. Commun.* 37 (1), 43-49.
- Maley, S.W., Buxton, D., Macalldowie, C.N., Anderson, I.E., Wright, S.E., Bartley, P.M., Esteban-Redondo, I., Hamilton, C.M., Storset, A.K., Innes, E.A., 2006. Characterization of the Immune Response in the Placenta of Cattle Experimentally Infected with *Neospora caninum* in Early Gestation. *J. Comp. Pathol.* 135 (2-3), 130-141.
- Marks, J., Lunden, A., Harkins, D., Innes, E., 1998. Identification of *Neospora* antigens recognized by CD4⁺ T cells and immune sera from experimentally infected cattle. *Parasite*

Immunol. 20 (7), 303-309.

• Mazuz, M.L., Fish, L., Wolkomirsky, R., Leibovich, B., Reznikov, D., Savitsky, I., Golenser, J., Shkap, V., 2015. The effect of a live *Neospora caninum* tachyzoite vaccine in naturally infected pregnant dairy cows. *Prev. Vet. Med.* 120 (2), 232-235.

• McAllister, M.M., Bjorkman, C., Anderson-Sprecher, R., Rogers, D.G., 2000. Evidence of point-source exposure to *Neospora caninum* and protective immunity in a herd of beef cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 217 (6), 881-887.

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

• McCann, C.M., McAllister, M.M., Gondim, L.F., Smith, R.F., Cripps, P.J., Kipar, A., Williams, D.J., Trees, A.J., 2007. *Neospora caninum* in cattle: Experimental infection with oocysts can result in exogenous transplacental infection, but not endogenous transplacental infection in the subsequent pregnancy. *Int. J. Parasitol.* 37 (14), 1631-1639.

• Ohtsuka, H., Murase, Y., Ando, T., Kohirumaki, M., Mukai, M., Oikawa, M., Petrovski, K.R., Morris, S., 2009. Effect of body condition score of the dairy cow on the in vitro immune response of peripheral blood mononuclear cells to progesterone stimulation. *J. Vet. Med. Sci.* 71 (5), 549-553.

• Pereira, G.R., Vogel, F.S.F., Bohrer, R.C., da Nóbrega Jr., J.E., Ilha, G.F., da Rosa, P.R.A., Glanzner, W.G., Camillo, G., Braunig, P., de Oliveira, J.F.C., Gonçalves, P.B.D., 2014. *Neospora caninum* DNA detection by TaqMan real-time PCR assay in experimentally infected pregnant heifers. *Vet. Parasitol.* 199 (3-4), 129-135.

• Pereira-Bueno, J., Quintanilla-Gozaló, A., Seijas-Carballado, A., Costas, E., Ortega Mora, L.M., 2000. Observational studies in *Neospora caninum* infected dairy cattle: pattern of transmission and age-related antibody fluctuations. In: Hemphill A., Gottstein B. A European perspective on *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* 30, 877-924.

• Pope, G.S., Gupta, S.K., Munro, I.B., 1969. Progesterone levels in the systemic plasma of pregnant, cycling and ovariectomized cows. *J. Reprod. Fertil.* 20 (3), 369-38.

• Quintanilla-Gozaló, A., Pereira-Bueno, J., Seijas-Carballado, A., Costas, E., Ortega Mora, L.M., 2000. Observational studies in *Neospora caninum* infected dairy cattle: relationship infection-abortion and gestational antibody fluctuations. In: Hemphill A., Gottstein B. A European perspective on *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* 30, 877-924.

• Rebordosa, X., Álvarez-García, G., Collantes-Fernández, E., Ortega-Mora, L.M., Artigas, C., 2000. Desarrollo de un ELISA indirecto para la valoración de anticuerpos contra *Neospora caninum*. *Laboratorio Veterinario, Avedila* 17, 5-8.

• Regidor-Cerrillo, J., Arranz-Solis, D., Benavides, J., Gomez-Bautista, M., Castro-Hermida, J.A., Mezo, M., Perez, V., Ortega-Mora, L.M., Gonzalez-Warleta, M., 2014. *Neospora caninum* infection during early pregnancy in cattle: how the isolate influences infection dynamics, clinical outcome and peripheral and local immune responses. *Vet. Res.* 45.

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

• Reichel, M.P., Moore, D.P., Hemphill, A., Ortega-Mora, L.M., Dubey, J.P., Ellis, J.T., 2015. A live vaccine against *Neospora caninum* abortions in cattle. *Vaccine* 33 (11), 1299-1301.

• Reichel, M.P., Alejandra Ayanegui-Alcérreca, M., Gondim, L.F.P., Ellis, J.T., 2013. What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle – The billion dollar question. *Int. J. Parasitol.* 43 (2), 133-142.

• Rojo-Montejo, S., Collantes-Fernández, E., Blanco-Murcia, J., Rodríguez-Bertos, A., Risco-Castillo, V., Ortega-Mora, L.M., 2009. Experimental infection with a low virulence isolate of *Neospora caninum* at 70 days gestation in cattle did not result in foetopathy. *Vet. Res.* 40 (5).

• Romero, J.J., Perez, E., Dolz, G., Frankena, K., 2002. Factors associated with *Neospora caninum* serostatus in cattle of 20 specialised Costa Rican dairy herds. *Prev. Vet. Med.* 53 (4), 263-273.

• Romero, J.J., Pérez, E., Frankena, K., 2004. Effect of a killed whole *Neospora caninum* tachyzoite vaccine on the crude abortion rate of Costa Rican dairy cows under field conditions. *Vet. Parasitol.* 123 (3-4), 149-159.

• Rosbottom, A., Gibney, E.H., Guy, C.S., Kipar, A., Smith, R.F., Kaiser, P., Trees, A.J., Williams, D.J., 2008. Upregulation of cytokines is detected in the placentas of cattle infected with *Neospora caninum* and is more marked early in gestation when fetal death is observed. *Infect. Immun.* 76 (6), 2352-2361.

• Rosbottom, A., Guy, C.S., Gibney, E.H., Smith, R.F., Valarcher, J.F., Taylor, G., Williams, D.J., 2007. Peripheral immune responses in pregnant cattle following *Neospora caninum* infection. *Parasite Immunol.* 29 (4), 219-228.

• Sager, H., Hussy, D., Kuffer, A., Schreve, F., Gottstein, B., 2005. First documentation of a neospora-induced "abortion storm" (exoge-

- nous transplacental transmission of *Neospora caninum*) in a Swiss dairy farm. Schweiz. Arch. Tierheilkd. 147 (3), 113-120.
- Saito, S., Nakashima, A., Shima, T., Ito, M., 2010. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. Am. J. Reprod. Immunol. 63 (6), 601-610, 1.
 - Salas-Calvo, J., Álvarez-García, G., Aguado-Martínez, A., Gomez-Bautista, M., Arnaiz-Seco, I., Ortega-Mora, L.M., 2005. Desarrollo de un ELISA para la detección de anticuerpos en leche frente a *Neospora caninum* en el ganado bovino. Congreso de Avedila 22-23 sept, 2005, Palma de Mallorca, España.
 - Schares, G., Barwald, A., Staubach, C., Sondgen, P., Rauser, M., Schroder, R., Peters, M., Wurm, R., Selhorst, T., Conraths, F.J., 2002. p38-avidity-ELISA: examination of herds experiencing epidemic or endemic *Neospora caninum*-associated bovine abortion. Vet. Parasitol. 106 (4), 293-305.
 - Schares, G., Barwald, A., Staubach, C., Ziller, M., Kloss, D., Wurm, R., Rauser, M., Labohm, R., Drager, K., Fasen, W., Hess, R.G., Conraths, F.J., 2003. Regional distribution of bovine *Neospora caninum* infection in the German state of Rhineland-Palatinate modelled by Logistic regression. Int. J. Parasitol. 33 (14), 1631-1640.
 - Schultz, R.D., Dunne, H.W., Heist, C.E., 1973. Ontogeny of the Bovine Immune Response. Infection and Immunity 7 (6), 981-991.
 - Schumacher, A., Costa, S.D., Zenclussen, A.C., 2014. Endocrine factors modulating immune responses in pregnancy. Front. Immunol. 5, 196.
 - Thilsted, J.P., Dubey, J.P., 1989. Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle. J. Vet. Diagn. Invest. 1 (3), 205-209.
 - Thurmond, M., Hietala, S., 1995. Strategies to control *Neospora* infection in cattle. The bovine practitioner 4 (29), 29-32.
 - Thurmond, M.C., Hietala, S.K., 1997. Effect of congenitally acquired *Neospora caninum* infection on risk of abortion and subsequent abortions in dairy cattle. Am. J. Vet. Res. 58 (12), 1381-1385.
 - Trees, A.J., Davison, H.C., Innes, E.A., Wastling, J.M., 1999. Towards evaluating the economic impact of bovine neosporosis. Int. J. Parasitol. 29 (8), 1195-1200.
 - Trees, A.J., McAllister, M.M., Guy, C.S., McGarry, J.W., Smith, R.F., Williams, D.J.L., 2002. *Neospora caninum*: oocyst challenge of pregnant cows. Vet. Parasitol. 109 (1-2), 147-154.
 - Trees, A.J., Williams, D.J.L., 2005. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. Trends Parasitol. 21 (12), 558-561.
 - Wegmann, T.G., Lin, H., Guilbert, L., Mosmann, T.R., 1993. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? Immunol. Today 14 (7), 353-356.
 - Weston, J.F., Heuer, C., Williamson, N.B., 2012. Efficacy of a *Neospora caninum* killed tachyzoite vaccine in preventing abortion and vertical transmission in dairy cattle. Prev. Vet. Med. 103 (2-3), 136-144.
 - Williams, D.J., Guy, C.S., McGarry, J.W., Guy, F., Tasker, L., Smith, R.F., MacEachern, K., Cripps, P.J., Kelly, D.F., Trees, A.J., 2000. *Neospora caninum*-associated abortion in cattle: the time of experimentally-induced parasitaemia during gestation determines foetal survival. Parasitology 121, 347-358.
 - Williams, D.J., Guy, C.S., Smith, R.F., Ellis, J., Bjorkman, C., Reichel, M.P., Trees, A.J., 2007. Immunization of cattle with live tachyzoites of *Neospora caninum* confers protection against fetal death. Infect. Immun. 75 (3), 1343-1348.
 - Williams, D.J., Guy, C.S., Smith, R.F., Guy, F., McGarry, J.W., McKay, J.S., Trees, A.J., 2003. First demonstration of protective immunity against foetopathy in cattle with latent *Neospora caninum* infection. Int. J. Parasitol. 33 (10), 1059-1065.
 - Wouda, W., Moen, A.R., Schukken, Y.H., 1998. Abortion risk in progeny of cows after a *Neospora caninum* epidemic. Theriogenology 49 (7), 1311-1316.