

**Rezumatul tezei de doctorat**  
**CERCETĂRI PRIVIND INFECȚIA CU *NEOSPORA CANINUM* ÎN ZONA DE**  
**VEST A ROMÂNIEI**

**Prezenta teză conține:**

*Listă de abrevieri*

*Rezumatele în limba română și engleză*

*Introducere*

*Stadiul actual al cunoașterii: 14 pagini*

*Cercetările proprii: 86 pagini*

*Tabele: 17*

*Figuri: 59*

*Surse bibliografice: 151*

*Anexe: 12*

Deși ”tânără” ca vârstă, agentul etiologic fiind identificat în 1984, neosporoză este o parazitoză care poate induce tulburări severe, mai ales în rândul animalelor de rentă. Poate determina pierderi economice de milioane de dolari prin avorturile apărute, eliminarea vacilor cu avorturi repetate cauzate de *N. caninum*, reînsămânțări, posibila pierdere a lactației, costurile legate de stabilirea diagnosticului și asistența profesională. În biologia parazitului intervin câinele, ca gazdă definitivă, la care se dezvoltă la nivelul tubului digestiv și, mai ales, bovinele, ca gazde intermediare, la care se dezvoltă sistemic, mai ales la nivelul sistemului nervos central, țesutului muscular scheletic și cardiac. Infecția gazdelor intermediare se realizează prin fitofagie sau geofagie, cu oochisturi sporulate, însă cea mai importantă cale de contaminare rămâne cea verticală, adică transplacentar.

Infecția cu *N. caninum* în zona de vest a României este subiectul acestei teze de doctorat și pe considerentul că această parazitoză este foarte puțin studiată în țara noastră, implică pierderi economice importante, dar și datorită dificultăților în ceea ce privește diagnosticul avorturilor asociate.

Teza conține o parte introductivă și cercetarea propriu-zisă. Aceasta din urmă este alcătuită din: I. Stadiul actual al cunoașterii.

II. Cercetări proprii.

III. Concluzii generale și recomandări

## IV. Elementele de originalitate.

În **primul capitol**, introductiv, sunt prezentate motivația alegerii temei de cercetare, importanța și actualitatea temei alese, o scurtă prezentare a conținutului și a obiectivelor științifice propuse cercetării.

**I. Stadiul actual al cunoașterii**

Această parte a tezei se extinde pe 14 pagini și cuprinde un singur capitol.

**Capitolul 2. Date generale privind neosporoză**

În acest capitol sunt dezbătute, pe scurt, unele aspecte generale ale etiologiei, ciclului evolutiv al parazitului, epizootologiei, patogenezei, modificărilor morfopatologice, tabloului clinic, diagnosticului, precum și tratamentul și profilaxiei.

La partea descriptivă a etiologiei sunt menționate cele două specii de *Neospora* – *caninum* și *hughesi* – dar și aspecte ale morfologiei parazitare, care vizează tachizoïții, chistul și oochistul, iar în ceea ce privește ciclul biologic, care este de tip diheteroxen, sunt amintite principalele gazde. Epidemiologia oferă date despre sursele de infecție, receptivitate și răspândire, iar modificările morfopatologice și semnele clinice sunt tratate în funcție de tipul de gazdă. La diagnostic sunt dezbătute atât metodele clasice de identificare a parazitului, cât și cele moderne, de tipul ELISA sau PCR, ultimele cu sensibilitate și specificitate crescute. Chiar dacă nu există o medicație strict specifică, partea de tratament și profilaxie amintește de unele încercări terapeutice mai mult sau mai puțin reușite, dar și de unele acțiuni profilactice dintre care pot fi amintite supravegherea populației canine, respectarea măsurilor de igienă, respectiv posibilitatea introducerii diagnosticului serologic ca măsură de supraveghere.

**II. Cercetări proprii**

Această parte se extinde pe 86 de pagini și este compusă din trei capitole, primul dintre ele cu trei subcapitole.

**3. Prevalența neosporozei bovine în vestul româniei****3.1. Teste serologice pentru depistarea neosporozei bovine în trei județe din vestul României**

Scopul acestui studiu a fost acela de a investiga serologic mai multe probe de sânge recoltate de la bovine crescute în sistem gospodăresc în zona de vest a României, pentru identificarea infecției cu *N. caninum*.

Pe parcursul perioadei iunie 2020 – aprilie 2021 au fost prelevate probe de sânge de la 368 de bovine (169 din județul Caraș-Severin, 101 din județul Timiș, respectiv 98 din județul Arad), crescute în sistem gospodăresc. Probele au provenit de la bovine din 19 localități din județul Caraș-Severin, 9 din județul Timiș, respectiv 7 din județul Arad. S-a utilizat kit-ul ID Screen® *Neospora caninum* Indirect, de la ID.Vet, France.

Din totalul celor 368 de probe investigate, doar 45 au fost pozitive, ceea ce reprezintă o prevalență generală de 12,23%. Pe județe, prevalența s-a prezentat astfel: 11,83% (20/169) pentru județul Caraș-Severin, 10,89% (11/101) pentru județul Timiș, respectiv 14,28% (14/98) pentru județul Arad.

Din totalul celor 19 localități din județul Caraș-Severin, în șase dintre acestea nu au fost identificate animale pozitive, reprezentând 31,57%. Totodată, prevalența totală pe localități nu a depășit în niciuna 1,77%, cele cu prevalența cea mai mare fiind: Poienile Boinei (1,77%), respectiv Stăncilova, Pătaș, Dalboșeț, Valea Răchitei și Răchita (toate cu câte 1,18%). De asemenea, cele mai multe animale pozitive din totalul celor 20 au fost identificate în comuna Șopotu Nou, adică 12, reprezentând 60%.

Pentru județul Timiș, din totalul celor 9 localități, doar în două dintre acestea nu au fost identificate animale pozitive, reprezentând 22,22%. Mai mult, prevalența totală pe localități nu a depășit în niciuna 2,97%, cele cu prevalența cea mai mare fiind: Ohaba Lungă (1,77%), respectiv Bethausen și Mănăștiur (ambele cu câte 1,98%). Referitor la prevalența locală a neosporozei, cea mai mare s-a dovedit a fi în localitatea Bara – 20%, urmată descrescător de localitatea Mănăștiur, cu 18,18%, respectiv Traian Vuia, cu 16,67%. Totodată, cele mai multe animale pozitive din totalul celor 11 au fost identificate în comuna Ohaba Lungă, adică 4, reprezentând 36,36%.

În județul Arad, din totalul celor 7 localități, doar în una dintre acestea nu au fost identificate animale pozitive, reprezentând 14,28%. Totodată, prevalența totală pe localități a fost printre cele mai ridicate, cele cu prevalența cea mai mare fiind: Sinteia Mare (5,10%), Mâsca (3,06%), respectiv Șepreuș și Târnova (ambele cu câte 2,04%). În ceea ce privește prevalența locală a neosporozei, cea mai mare s-a dovedit a fi tot în localitatea Sinteia Mare – 21,74%, urmată descrescător de localitatea Mâsca, cu 20%, respectiv Șepreuș, cu 14,28%. De asemenea, cele mai multe animale pozitive din totalul celor 14 au fost identificate în comuna Sinteia Mare, respectiv 5, reprezentând 35,71%.

Din cele 35 de localități investigate, puțin peste 25% au fost sero- pozitive.

### 3.2. Teste ELISA din lapte pentru depistarea neosporozei bovine în trei județe din vestul României

Această cercetare a urmărit eventuala prezență a anticorpilor anti-*Neospora* la nivel individual în probele de lapte, la bovine din trei județe din vestul României.

Pe parcursul perioadei iunie 2020 – aprilie 2021 au fost prelevate probe de lapte de la 184 de bovine (108 din județul Caraș-Severin, 47 din județul Timiș, respectiv 29 din județul Arad), crescute în sistem gospodăresc. S-a utilizat același kit ID Screen® *Neospora caninum* Indirect, de la ID.Vet, France, conform instrucțiunilor producătorului.

Din cele 184 de probe investigate, doar 19 au fost pozitive, reprezentând o prevalență generală de 10,32%, raportată la toate cele trei județe luate în studiu. Prevalența infecției cu *N. caninum* a fost de 24,13% (7/29) în județul Arad, de 12,76% (6/47) în județul Timiș, respectiv 5,55% (6/108) în județul Caraș-Severin. Totodată, 10,34% (3/24) din probele de lapte provenite din județul Arad au fost neconcludente.

Luând în discuție județul Caraș-Severin, toate cele 108 probe de lapte prelucrate prin metoda ELISA au provenit de la bovine din aceleași 19 localități din care au fost prelevate și probe de sânge. Cea mai mare prevalență locală a fost consemnată în localitatea Urcu (22,22%), în care două probe au fost pozitive din cele nouă investigate, urmată de Valea Răchitei (20%), cu două probe pozitive din 10 examinate.

În ceea ce privește județul Timiș, cele 47 de probe de lapte examinate au provenit doar din patru localități ale județului, spre deosebire de nouă în cazul probelor de sânge. Singurele localități pozitive au fost cele două Ohabe, cu prevalența cea mai mare în Ohaba Lungă (18,18% cea locală și 8,51% cea generală). Totodată, din cele patru localități investigate, doar două (50%) au fost pozitive. Ponderea probelor de lapte negative a fost de 87,23%

Pentru județul Arad doar 29 de probe de lapte au fost examinate. Acestea au provenit din cinci localități, cu două mai puține decât în cazul probelor de sânge, iar una dintre acestea diferită față de cele incluse pentru probele de sânge. Din cele cinci localități testate, doar patru dintre ele au furnizat probe pozitive (80%), iar una a fost negativă (20%). Cele mai mari prevalențe locale au fost înregistrate în localitățile Sinteia Mare, respectiv Șiria, ambele cu 33,33%, iar cea mai mică prevalență a fost consemnată în localitatea Măderat, cu 12,50%. Cele două probe prvenite din Galșa au fost negative. Pentru prevalența generală, cea mai mare valoare a fost observată în localitatea Sinteia Mare (10,34%), iar cea mai mică în localitățile Șiria și Măderat, cu câte 3,44%.

În cazul prevalenței serice, nu au fost variații semnificative pentru cele trei județe investigate, rezultatele fiind situate între 85,71% (Arad) și 89,11% (Timiș). În schimb, pentru

lactoprevalență s-au constatat diferențe semnificative în ceea ce privește negativitatea probelor, datele obținute oscilând între 75,86% (Arad), respectiv 94,48% (Caraș-Severin).

Din cele 28 de localități investigate, doar 10 (35,71%) au furnizat probe pozitive.

### 3.3. Teste serologice pentru depistarea neosporozii la cabaline din județul Vâlcea

Scopul acestui studiu a fost cel de a identifica prezența infecției cu *Neospora* spp. la cabaline din județul Vâlcea.

Pe parcursul perioadei aprilie 2023 – iunie 2023 au fost prelevate probe de sânge de la 92 de cabaline din județul Vâlcea, crescute în sistem gospodăresc. Examinarea s-a realizat la DSVSA Râmnicu-Vâlcea, cu același kit ID Screen® *Neospora caninum* Indirect, de la ID.Vet, France. Toate probele examinate în județul Vâlcea au provenit de la cabaline fără semne clinice, utilizate la muncile din gospodărie.

Din cele 92 de probe examinate prin ELISA, niciuna nu a fost pozitivă, doar trei fiind neconcludente (3,26%). Analizând prevalența locală a cazurilor dubioase, aceasta a fost de 10% pentru fiecare din cele trei localități în care au fost identificate aceste cazuri, iar cea generală a fost de 1,08%, de asemenea pentru toate localitățile luate în studiu.

## 4. Identificarea prin PCR a infecției cu *Neospora* spp. în țesuturile fetale

În prezentul capitol s-a urmărit evidențierea infecției cu *Neospora caninum* în diverse țesuturi ale avortonilor de la mai multe specii de animale de rentă, prin metoda PCR clasic, comparativ cu alt protozoar abortigen, considerat mult mai patogen și zoonotic.

În perioada martie 2022 – martie 2023 au fost colectați mai mulți avortoni, după cum urmează: trei viței (unul din județul Timiș și doi din județul Vâlcea), un ied și doi miei din județul Vâlcea. Vârsta avortonilor a fost cuprinsă între 3 și 7 luni. După dezghețarea avortonilor au fost recoltate probe din creier, ficat, inimă și rinichi, care au fost prelucrate pentru PCR. Amplificarea propriu zisă s-a realizat prin PCR clasic și s-a bazat pe crearea mai multor copii a unei secvențe a genei Nc-5 cu perechile de primeri Np6+ și Np21+, care amplifică un fragment de 328 bp.

Au fost supuse analizei probe de la vițelul 2 (godeurile 1-creier, 2-ficat, 3-inimă, 4-rinichi), ied (godeurile 5-creier, 6-inimă, 7-rinichi, 8-ficat), miel 2 (godeurile 9-creier, 10-ficat, 11-splină), miel 1 (godeurile 12-ficat, 13-creier, 14-rinichi), respectiv vițel 1 (godeurile 15-ficat, 16-rinichi, 17-creier, 18-inimă).

Din cele 18 godeuri testate, reacție pozitivă, la aprox. 328 bp, s-a obținut doar în patru dintre acestea și anume în godeul 5 (creier ied), 7 (rinichi ied), 8 (ficat ied), respectiv 17 (creier vițel). Cele mai intense benzi s-au obținut la godeurile 5 și 17, cele în care a fost testat creierul de ied, respectiv de vițel, iar mai estompate au fost la godeurile 7 și 8, în care au fost testate alte organe provenite de la ied.

De asemenea, probele pozitive au fost testate comparativ cu *Toxoplasma gondii*. Pentru aceasta din urmă rezultatele au fost negative, ceea ce demonstrează că infecția a fost produsă de *Neospora caninum*.

Totodată, specia *N. caninum* a fost identificată prin secvențiere. Analiza BLAST a evidențiat similitudine cu izolatele KF649845 și KP715562.

## **5. Anchetă epidemiologică pe bază de chestionar privind factorii de risc în evoluția neosporozei în zona de vest a României**

Acest studiu a vizat identificarea factorilor de risc care influențează transmiterea și evoluția infecției cu *N. caninum*, pe baza unui chestionar aplicat în zona de vest a României.

Au fost împărțite 125 de chestionare în localitățile de proveniență a probelor de sânge, după cum urmează: 57 în județul Caraș-Severin, 37 în județul Timiș și 31 în județul Arad. Au fost recuperate doar 97, ceea ce reprezintă doar 77,60%.

Majoritatea exploatațiilor supuse studiului (93,81%) au fost fost gospodării tradiționale, cu un număr mic de animale aflate în întreținere. Vârsta animalelor din ferme a fost bine echilibrată, animalele cu vârsta cuprinsă între 2 și 8 ani deținând ponderea (78,02%), interval considerat foarte important în cazul transmiterii verticale a neosporozei. Cele mai multe bovine au avut acces la pășune, ceea ce ar reprezenta un factor de risc important pentru realizarea infecției, iar calitatea pășunilor este una bună, doar 8,24% dintre acestea fiind într-o stare necorespunzătoare. În cele mai multe exploatații condițiile de întreținere a animalelor sunt corespunzătoare, însă acțiunile DDD, fie nu se fac (64,95%), fie sunt sporadice (19,58%). Toate gospodăriile incluse în studiu au beneficiat de prezența mai multor specii de animale, câinii fiind omniprezenți, iar caii mai puțin reprezentați, fiind prezenți în doar 44,33% din gospodării. Numărul câinilor din gospodării a fost ridicat, neexistând exploatație fără cel puțin un câine. Administrarea resturilor animale (inclusiv avortonii și/sau placentele) în hrana câinilor este o practică obișnuită a fermierilor. Majoritatea fermierilor (94,85%) sunt de acord că există câini liberi, care frecventează pășunea și, de asemenea, există și posibilitatea contactului cu canide sălbatice (85,56%).

**PhD Thesis summary**  
**RESEARCHES REGARDING THE INFECTION WITH NEOSPORA CANINUM IN  
WESTERN ROMANIA**

The present thesis consists of:

*List of abbreviations*

*Summary in Romanian and English*

*Introduction*

*The current status of knowledge: 14 pages*

*Own researches: 86 pages*

*Tables: 17*

*Figures: 59*

*Bibliographic resources: 151*

*Annexes: 12*

Although relatively “young” in terms of its discovery—the etiological agent being identified in 1984—neosporosis is a parasitic disease capable of inducing severe disorders, particularly among livestock. It can cause economic losses amounting to millions of dollars through abortion events, the culling of cows with repeated abortions caused by *Neospora caninum*, repeated inseminations, potential loss of lactation, diagnostic costs, and the need for professional veterinary assistance.

In the biology of the parasite, the dog acts as the definitive host, where the parasite develops in the digestive tract. Cattle, however, serve as the primary intermediate hosts, with systemic development occurring predominantly in the central nervous system, skeletal muscle tissue, and cardiac muscle. Infection in intermediate hosts typically occurs through phytophagy or geophagy involving sporulated oocysts; however, the most significant route of transmission remains vertical—namely, transplacental infection.

The infection with *N. caninum* in the western region of Romania is the subject of this doctoral thesis. This focus is justified by the fact that neosporosis remains a poorly studied parasitosis in Romania, it carries considerable economic implications, and presents diagnostic challenges, especially in association with abortion cases.

The thesis includes an introductory part and the core research sections, structured as follows:

- **I. State of the art**

- **II. Original Research**
- **III. General Conclusions and Recommendations**
- **IV. Elements of Originality**

In the first, **introductory chapter**, the motivation for choosing the research topic is presented, along with the importance and relevance of the chosen subject, a brief overview of the content, and the scientific objectives pursued through this study.

## **I. State of the art**

This part of the thesis extends on 14 pages and comprises a single chapter.

### **Chapter 2. General information on Neospora**

This chapter briefly discusses several general aspects related to the etiology, life cycle of the parasite, epizootiology, pathogenesis, morphopathological changes, clinical presentation, diagnosis, as well as treatment and prevention strategies.

In the section on etiology, the two known species of *Neospora*—*N. caninum* and *N. hughesi*—are mentioned, along with key elements of parasite morphology, focusing on tachyzoites, tissue cysts, and oocysts. The biological cycle, which is classified as diheteroxenous, includes reference to the main host species involved. The epidemiological overview provides data concerning infection sources, host susceptibility, and patterns of distribution. Morphopathological changes and clinical signs are described according to the type of host affected.

The diagnostic section examines both classical methods for identifying the parasite and modern techniques such as ELISA and PCR, the latter offering improved sensitivity and specificity. Although there is currently no strictly specific medication available, the section on treatment and prevention outlines various therapeutic attempts—some more effective than others—as well as preventive measures. These include monitoring of the canine population, adherence to hygiene practices, and the potential implementation of serological screening as a surveillance tool.

## **II. Original research**

This part extends on 86 pages and is made of three chapters, the first one with three subchapters.

### 3. Prevalence of bovine neosporosis in western Romania

#### 3.1. Serological Testing for the Detection of Bovine Neosporosis in Three Counties of Western Romania

The aim of this study was to conduct a serological investigation of blood samples collected from cattle raised in small-scale (household) farming systems in the western region of Romania, in order to detect infection with *Neospora caninum*.

During the period from June 2020 to April 2021, blood samples were collected from a total of 368 cattle (169 from Caraș-Severin County, 101 from Timiș County, and 98 from Arad County), all raised in household settings. The samples originated from 19 localities in Caraș-Severin, 9 in Timiș, and 7 in Arad. The diagnostic test used was the **ID Screen® *Neospora caninum* Indirect ELISA kit** (ID.Vet, France).

Out of the 368 samples analyzed, **only 45 tested positive**, corresponding to an **overall seroprevalence of 12.23%**. Seroprevalence by county was as follows: **11.83% (20/169)** for Caraș-Severin, **10.89% (11/101)** for Timiș, and **14.28% (14/98)** for Arad.

In Caraș-Severin County, of the 19 localities sampled, no positive animals were found in six, representing **31.57%** of the localities. Furthermore, the seroprevalence at the locality level did not exceed **1.77%** in any area. The highest prevalence rates were recorded in Poienile Boinei (1.77%), followed by Stăncilova, Pătaș, Dalboșeț, Valea Răchitei, and Răchita (each with 1.18%). The highest number of positive animals in the county was recorded in the commune of Șopotu Nou, where **12 positive cases** were identified, representing **60%** of the county's total.

In Timiș County, of the 9 localities examined, only two had no positive animals, accounting for **22.22%**. None of the localities exceeded a total seroprevalence of **2.97%**. The highest rates were observed in Ohaba Lungă (1.77%), and in Bethausen and Mănăștiur (each with 1.98%). At the locality level, the highest prevalence of neosporosis was found in Bara (20%), followed by Mănăștiur (18.18%) and Traian Vuia (16.67%). Most of the county's positive animals were identified in Ohaba Lungă, where **4 out of the 11 positive cases** were found (**36.36%**).

In Arad County, out of 7 localities, only one had no positive cases, representing **14.28%**. Overall, this county showed some of the highest locality-level prevalence rates. The most affected localities were Sinteia Mare (5.10%), Mâsca (3.06%), and Șepreuș and Târnova (each with 2.04%). The highest local prevalence was also recorded in Sinteia Mare (21.74%), followed by Mâsca (20%) and Șepreuș (14.28%). The majority of positive cases in Arad—**5 out of 14** (35.71%)—were detected in Sinteia Mare.

Across the 35 localities investigated, just over **25% showed seropositive results**.

### 3.2. Milk ELISA Testing for the Detection of Bovine Neosporosis in Three Counties of Western Romania

This study aimed to investigate the possible presence of anti-*Neospora caninum* antibodies in individual milk samples collected from cattle in three counties located in western Romania.

During the period from June 2020 to April 2021, milk samples were collected from **184 cattle** (108 from Caraș-Severin County, 47 from Timiș County, and 29 from Arad County), all raised in household farming systems. The **ID Screen® *Neospora caninum* Indirect ELISA kit** (ID.Vet, France) was used for testing, following the manufacturer's instructions.

Out of the 184 samples analyzed, **only 19 tested positive**, resulting in an **overall seroprevalence of 10.32%** across all three counties. The infection rates by county were: **24.13% (7/29)** in Arad, **12.76% (6/47)** in Timiș, and **5.55% (6/108)** in Caraș-Severin. Additionally, **10.34% (3/29)** of the milk samples from Arad were deemed inconclusive.

In Caraș-Severin County, all 108 milk samples processed via ELISA originated from the same 19 localities as the previously collected blood samples. The highest local prevalence was recorded in the village of **Urcu (22.22%)**, where 2 out of 9 samples tested positive, followed by **Valea Răchitei (20%)**, with 2 out of 10 samples testing positive.

In Timiș County, the 47 milk samples came from only **four localities**, compared to nine for the blood samples. The only positive results were found in **the two Ohaba localities**, with the highest local prevalence observed in **Ohaba Lungă (18.18% locally, 8.51% overall)**. Of the four localities examined, only two (50%) yielded positive samples. The proportion of negative milk samples was **87.23%**.

In Arad County, only 29 milk samples were analyzed. These originated from **five localities**, two fewer than in the case of the blood samples, with one of them being different from those included in the serological blood sampling. Of the five localities tested, **four yielded positive samples (80%)**, while **one locality (20%)** returned only negative results. The highest local prevalence rates were recorded in **Sintea Mare and Șiria**, both with **33.33%**, while the lowest was noted in **Măderat (12.50%)**. The two samples from **Galșa** tested negative. Regarding overall prevalence, the highest value was observed in **Sintea Mare (10.34%)**, followed by **Șiria and Măderat**, each with **3.44%**.

In the case of seroprevalence, no significant variations were observed among the three counties investigated, with results ranging between **85.71% (Arad)** and **89.11% (Timiș)**. In contrast, for milk-based prevalence (lactoprevalence), significant differences were noted

regarding the proportion of negative samples, with results ranging from **75.86% in Arad** to **94.48% in Caraș-Severin**.

Out of the 28 localities surveyed, **only 10 (35.71%) yielded positive samples**.

### 3.3. Serological Testing for the Detection of Neosporosis in Equines from Vâlcea County

The aim of this study was to identify the presence of *Neospora* spp. infection in equines from Vâlcea County.

Between April 2023 and June 2023, blood samples were collected from **92 horses** raised in household systems across Vâlcea County. The testing was conducted at the DSVSA Râmnicu-Vâlcea laboratory using the **ID Screen® *Neospora caninum* Indirect ELISA kit** (ID.Vet, France). All sampled horses were clinically healthy and used for household labor.

Of the 92 samples tested by ELISA, **none tested positive**, with only **three samples returning inconclusive results (3.26%)**. When assessing the local prevalence of inconclusive cases, a rate of **10%** was recorded in each of the three localities where such cases were identified. The overall inconclusive prevalence across all sampled localities was **1.08%**.

## 4. PCR identification of *Neospora* spp. infection in foetal

This chapter aimed to detect *Neospora caninum* infection in various tissues of aborted fetuses from multiple livestock species, using conventional PCR, in comparison with another abortigenic protozoan, considered more pathogenic and zoonotic.

Between March 2022 and March 2023, several aborted fetuses were collected, as follows: three calves (one from Timiș County and two from Vâlcea County), one kid, and two lambs from Vâlcea County. The age of the fetuses ranged from 3 to 7 months. After thawing, samples were collected from the brain, liver, heart, and kidneys, and processed for PCR. Amplification was carried out using conventional PCR and was based on the replication of a segment of the Nc-5 gene using the primer pair Np6+ and Np21+, which amplifies a 328 bp fragment.

The following samples were subjected to analysis: calf 2 (wells 1–brain, 2–liver, 3–heart, 4–kidney), kid (wells 5–brain, 6–heart, 7–kidney, 8–liver), lamb 2 (wells 9–brain, 10–liver, 11–spleen), lamb 1 (wells 12–liver, 13–brain, 14–kidney), calf 1 (wells 15–liver, 16–kidney, 17–brain, 18–heart).

Out of the 18 wells tested, a positive reaction at approximately 328 bp was obtained in only four of them, specifically in well 5 (kid brain), 7 (kid kidney), 8 (kid liver), and 17 (calf brain). The most intense bands were observed in wells 5 and 17, which tested brain tissue from

the kid and the calf, respectively, while weaker bands appeared in wells 7 and 8, which contained other organs from the kid.

Additionally, the positive samples were tested for comparison with *Toxoplasma gondii*. For the latter, the results were negative, confirming that the infection was caused by *Neospora caninum*.

Moreover, the species *N. caninum* was confirmed by sequencing. BLAST analysis revealed similarity with isolates KF649845 and KP715562.

## **5. Questionnaire-Based Epidemiological Survey on Risk Factors Influencing the Evolution of Neosporosis in Western Romania**

This study aimed to identify the risk factors influencing the transmission and progression of *Neospora caninum* infection, based on a questionnaire administered in the western region of Romania.

A total of 125 questionnaires were distributed in the localities from which blood samples were previously collected, as follows: 57 in Caraș-Severin County, 37 in Timiș County, and 31 in Arad County. Only 97 questionnaires were recovered, representing 77.60% of the total.

The majority of the farms included in the study (93.81%) were traditional household holdings, maintaining a small number of animals. The age of the animals was well balanced, with those aged between 2 and 8 years representing 78.02% of the total—a range considered particularly important for the vertical transmission of neosporosis.

Most cattle had access to pasture, which may constitute a significant risk factor for infection. The quality of pastures was generally good, with only 8.24% reported to be in poor condition. In most farms, the general maintenance and housing conditions were appropriate; however, DDD measures (disinfection, disinsectisation, and deratization) were either not performed (64.95%) or applied only sporadically (19.58%).

All households included in the study housed multiple animal species, with dogs being omnipresent, while horses were less frequently present, found in only 44.33% of the farms. The number of dogs was high, with no household lacking at least one dog. The practice of feeding animal remains (including aborted fetuses and/or placentas) to dogs was commonly reported among farmers.

The vast majority of respondents (94.85%) acknowledged the presence of free-roaming dogs that frequented pastures, and 85.56% indicated the potential for contact with wild canids, both representing notable risk factors for the environmental persistence and transmission of *Neospora caninum*.