Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie

Neosporosi bovina

> LINEE GUIDA

LG *in*VET5

Istituto Zooprofilattico
Sperimentale delle Venezie

LGinVET - Collana a cura di

Gaddo Vicenzoni
Direttore
Dipartimento di patologia animale e sanità pubblica
SCT1 Verona e Vicenza

Testo redatto da
Antonio Barberio
Medico veterinario
SCT1 Verona e Vicenza
Laboratorio diagnostica clinica e sierologia di piano
Responsabile Gaddo Vicenzoni

Alda Natale
Direttore *ad interim*
SCT3 Padova e Rovigo
Diagnostica in sanità animale

Layout e impaginazione
SCS7 Comunicazione e conoscenza per la salute
Laboratorio comunicazione della scienza
Responsabile Licia Ravarotto

Foto
Archivio IZSVe

Nonostante l'attenzione dedicata alla stesura della pubblicazione e i controlli effettuati sulle immagini e sui contenuti, qualche errore potrebbe essere sfuggito alle nostre verifiche. Ce ne scusiamo con i lettori e li invitiamo a trasmetterci eventuali osservazioni.

Si dichiara che il presente documento è stato redatto in assenza di conflitti di interesse e in condizioni di indipendenza rispetto a fonti di finanziamento privato.

Le presenti linee guida saranno aggiornate periodicamente ogni tre anni, o secondo necessità, sulla base dell'evoluzione delle conoscenze scientifiche.

I edizione: novembre 2017

Copyright © 2017 by Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie

Riproduzione vietata ai sensi di legge (art. 171 della legge 22 aprile 1941, n° 633)

Pubblicazione non in vendita

I lettori che desiderano informazioni e aggiornamenti sulle attività dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie possono visitare il sito web www.izsvenezie.it

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie

Neosporosi bovina

> LINEE GUIDA

LG *in* VET5

Antonio Barberio* - Alda Natale*

* Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie

REFEREE

Simone Magnino
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna
Laboratorio di Pavia

Gioia Capelli
Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie

Si ringraziano il dott. Simone Magnino e la dott.ssa Gioia Capelli per il tempo e l'impegno profusi nel lavoro di revisione delle presenti Linee guida

PRESENTAZIONE

La neosporosi è stata descritta per la prima volta in Norvegia nel 1984 in un cane. Inizialmente fu confusa con *Toxoplasma gondii*, protozoo parassita strettamente correlato. Solo nel 1988 è stata classificata come nuova specie e denominata *Neospora caninum*. Da allora la neosporosi si è rivelata una patologia estremamente diffusa nella specie bovina e nel cane in tutto il mondo, rappresentando una delle più importanti cause di aborto e natimortalità nell'allevamento bovino, in particolare nel settore della produzione lattiero-casearia.

In Italia, non essendo mai stati applicati piani di controllo ufficiali, i dati di sieroprevalenza si deducono da studi locali, con ampie variabilità di stima dovute ai metodi diagnostici applicati, al tipo di allevamento, alla valutazione condotta a livello individuale o aziendale. La sieroprevalenza individuale varia dal 22% al 64%, quella aziendale dal 55% al 77%. Studi condotti dall' IZSVe nella regione Veneto in una popolazione di quasi 2000 vacche da latte hanno dimostrato sieroprevalenze significativamente superiori negli animali che avevano abortito (43,2%) rispetto alla totalità della popolazione. A livello mondiale è stato stimato che *Neospora caninum* sia responsabile di aborto nella specie bovina in un range percentuale che va dal 15 al 21%.

A fronte dell'estrema diffusione del parassita, gli strumenti di controllo sono ad oggi limitati, tanto da consigliare talvolta l'opportunità di limitare gli effetti clinici di questo patogeno agendo in modo indiretto, con il controllo di altri agenti infettivi "complicanti" presenti in allevamento (ad es. BVD virus), piuttosto che attraverso un programma di controllo/eradicazione.

Si è ritenuto importante trasferire ai veterinari pubblici e liberi-professionisti le conoscenze emerse in questi ultimi anni al fine di migliorare le capacità diagnostiche ed operative di tutti i colleghi che seguono, con diverse funzioni, gli allevamenti di bovine da latte.

La presente linea guida illustra in modo sintetico lo stato dell'arte delle attuali conoscenze sulla neosporosi bovina e contiene una serie di raccomandazioni e consigli operativi pratici derivanti dall'analisi delle evidenze scientifiche pubblicate su riviste internazionali. L'obiettivo finale è fornire ai colleghi veterinari una serie d'informazioni che possano essere d'ausilio nella prevenzione, nel processo diagnostico e nella gestione dei casi clinici riscontrati durante la loro attività lavorativa.

Antonio Barberio, DVM, PhD
Alda Natale, DVM, PhD
Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie

INDICE

Introduzione 9

Guida ai livelli di prova e alla forza delle raccomandazioni 11

Capitoli

1. Eziologia, ciclo biologico ed epidemiologia 15

2. Descrizione della forma clinica 19

3. Lesioni anatomo-patologiche 21

4. Patogenesi 23

4.1 Patogenicità dei diversi ceppi e loro tipizzazione 25

5. Epidemiologia 27

5.1 Vie di escrezione e trasmissione del microrganismo 27

5.2 Sopravvivenza nell'ambiente 28

5.3 Recettività degli animali all'infezione 29

5.4 Introduzione dell'infezione in allevamento e fattori di rischio 29

6. Diagnosi 33

6.1 Prelievo, conservazione e trasporto del campione 36

6.2 Fattori analitici 37

7. Interventi nelle aziende infette 41

8. Vaccinazione 47

9. Ruolo come agente zoonosico 49

Bibliografia 51

Introduzione

La Neosporosi è una malattia parassitaria sostenuta dal protozoo *Neospora caninum* e rappresenta una delle più importanti cause di aborto e natimortalità nell'allevamento bovino.

Neospora caninum appartiene al *phylum* Apicomplexa ed è strettamente correlato a *Toxoplasma gondii*. Fu descritto per la prima volta in cani affetti da encefalite e miosite in Norvegia nel 1984 (Bjerkas, et al.); più tardi fu dimostrato in molti altri mammiferi tra cui vacche, capre, cavalli, pecore, suini e alcune specie aviarie. Il parassita è ampiamente diffuso negli allevamenti bovini in Italia (Otranto et al., 2003) ed è riconosciuto come una delle più importanti cause di aborto nella vacca da latte (Haddad et al., 2005; Reichel et al., 2013).

Da indagini eseguite in California, Olanda, Svizzera e Spagna risulta che *Neospora caninum* è responsabile di aborti nella specie bovina in un range compreso tra il 15 e il 21% dei feti esaminati (Sager et al., 2001; Pereira-Bueno et al., 2003; Haddad et al., 2005).

In Veneto, piano regionale per il controllo degli aborti infettivi ha rilevato dati allineati alla letteratura internazionale, evidenziando percentuali di positività alla ricerca diretta del parassita nei feti abortiti variabili tra l'11,5% e il 21,1% e percentuali di positività sierologica variabili tra il 35,5% e il 40,5% nelle bovine che avevano abortito (dati 2005-2008). In Lombardia la ricerca diretta su feti abortiti ha rivelato una prevalenza individuale del 29,3% e interaziendale del 39,2% (Magnino et al, 2001).

E' stato stimato che le bovine sieropositive abbiano mediamente un rischio di aborto da 2 a 3,5 volte maggiore rispetto a vacche sieronegative (OR 5,7), inoltre un animale sieropositivo che ha abortito ha un elevato rischio di abortire nuovamente (Haddad et al., 2005; Reichel et al, 2014).

E' opinione comune tra diversi autori che la prevalenza di neosporosi nelle bovine di razze lattifere sia superiore rispetto a quella delle razze da carne, allo zebù e al bufalo (Guarino et al, 2000; Gennari et al, 2005; Asmare et al, 2013; Reichel et al, 2014; Reichel et al, 2015), ma non è chiaro se ciò sia imputabile al diverso management di allevamento o piuttosto a una reale differenza nella sensibilità all'infezione.

Oltre all'evento abortivo, l'infezione da *Neospora caninum* è stata associata a un aumento della percentuale di rimonta e a una diminuzione della produzione di latte (Thurmond & Vietala, 1996-1997). Si ritiene però che quest'associazione sia più strettamente correlata all'evento aborto che allo stato di infezione in sé (Hobson et al, 2002; Haddad et al., 2005; Bartels, et al, 2006). La neosporosi non sembra pertanto avere un effetto negativo diretto sulla produzione di latte.

Le prevalenze inter-allevamento sono note soltanto nei paesi dove sono stati attuati piani di controllo, quali ad esempio Svezia, Germania, Olanda, Spagna, Portogallo e variano tra il 10% e l'84% (Bartels, et al, 2006; Reichel et al, 2014). I piani di controllo applicati, generalmente su base volontaria e basati principalmente sull'applicazione di misure di biosicurezza, si sono dimostrati efficaci nel ridurre le sieroprevalenza, ma a livello aziendale è difficile proteggere gli animali da nuovi ingressi dell'infezione per via orizzontale. Tale rischio non garantisce all'allevatore il mantenimento dello stato sanitario di negatività.

In Italia, non essendo mai stati applicati piani di controllo ufficiali, i dati di prevalenza si deducono da studi locali. In Sardegna, indagini condotte tramite IFAT hanno rilevato tassi di prevalenza del 64% nei bovini da latte monitorati (Masala et al. 2000), mentre le aziende positive sono risultate il 55%, tramite l'analisi del latte di massa con un test iscom ELISA (Varcasia et al. 2006). In Sicilia la sieroprevalenza media individuale mediante ELISA risulta pari al 26,2%, mentre la prevalenza interaziendale è del 77,8% (Cascone et al., 2002). In Veneto uno studio condotto su 1925 vacche da latte ha rilevato una sieroprevalenza media del 22%, con un 43,2% negli animali che avevano abortito (Nardelli et al., 2005).

La Neosporosi rappresenta in Italia, come in molti altri paesi, un problema serio con conseguenze economiche rilevanti, tuttavia a oggi gli strumenti di controllo dell'infezione sono limitati. Mancano misure di profilassi per evitare nuove introduzioni dell'infezione per via orizzontale e il mantenimento dello status di indennità. I pareri degli esperti sono concordi nelle indicazioni delle misure di controllo, ma in alcuni casi la "do nothing option" è la strategia consigliata in considerazione del bilancio tra costi e benefici.

Per poter impostare piani di controllo è necessario avere informazioni precise derivanti da procedure standardizzate; conoscere valore predittivo dei metodi diagnostici a disposizione; valutare la fattibilità del piano anche in base all'analisi del costo/beneficio; conoscere gli aspetti epidemiologici della malattia; fare opera di convincimento nei confronti degli allevatori e delle loro associazioni di categoria.

Guida ai livelli di prova e alla forza delle raccomandazioni

Nelle linee guida, le raccomandazioni vengono qualificate con un certo grado di forza della raccomandazione (FDR) e di livello di prova (LDP), espressi rispettivamente in lettere (da A a E) e in numeri romani (da I a VI). La Forza delle Raccomandazioni indica la probabilità che l'applicazione nella pratica di una raccomandazione sia utile ai fini sanitari. Il livello di Prova indica la probabilità che un certo numero di conoscenze sia derivato da studi pianificati e condotti in modo tale da produrre informazioni valide e prive di errori sistematici. Tuttavia la forza delle raccomandazioni non si deve basare soltanto sul tipo di disegno di studio, ma deve considerare anche altri fattori quali: l'applicabilità, l'accettabilità e l'economicità dell'intervento.

Forza delle raccomandazioni		Livelli di prova delle raccomandazioni	
A	comportamento o intervento fortemente raccomandato	I	in base a più studi clinici randomizzati e controllati, o revisioni sistematiche
B	comportamento o intervento raccomandato	II	in base ad almeno uno studio clinico randomizzato
C	comportamento o intervento da considerare, ma di impatto incerto	III	in base a studi di coorte
D	comportamento o intervento da disincentivare	IV	in base a studi caso-controllo
E	fortemente sconsigliato	V	in base a studi su serie di casi senza gruppo di controllo
		VI	in base a opinioni di esperti

Gli obiettivi di queste Linee guida sono:

1. Descrivere le conoscenze di base (microbiologiche, cliniche, anatomopatologiche, patogenetiche, epidemiologiche, analitiche, gestionali)
2. Indicare le misure di management sanitario (biosicurezza e biocontenimento) necessarie per valutare l'opportunità dell'applicazione di un piano di controllo negli allevamenti infetti

642

1. Eziologia, ciclo biologico ed epidemiologia

1. Eziologia, ciclo biologico ed epidemiologia

Neospora caninum è un protozoo appartenente al *phylum* Apicomplexa (vedi fig. 1) strettamente correlato a *Toxoplasma gondii*.

E' stata classificata soltanto un'altra specie di Neospora, *Neospora hughesi*, che è responsabile di forme cliniche nel cavallo.

Il ciclo vitale del parassita prevede la necessità di un ospite definitivo per la fase sessuata del ciclo (produzione di oocisti) e di vari ospiti intermedi che consentono una replicazione asessuata (produzione di tachizoiti). Il ciclo biologico del parassita è rappresentato in Fig. 1.

I cani e altri canidi, che rappresentano l'ospite definitivo, si infettano ingerendo i tachizoiti o i bradizoiti presenti nei tessuti degli ospiti intermedi, come il feto e gli invogli fetali (Dijsktra et al., 2001). Nel tratto intestinale del cane avviene la riproduzione sessuata con produzione di oocisti infettanti (Lindsay et al., 1999; McAllister et al., 1998), che sono eliminate attraverso le feci e restano vitali nell'ambiente per molti mesi (Dubey, 2004); esse rappresentano la via di trasmissione orizzontale nei confronti di altri ospiti definitivi e degli ospiti intermedi (McAllister et al., 1996; McAllister et al., 2000). Le oocisti sono emesse dal cane per via fecale a partire da una settimana circa post-infezione e la durata di emissione è mediamente inferiore alle 2 settimane (Gondim et al, 2002; Rodrigues et al, 2004; Mc Allister, 2016); raramente l'emissione può protrarsi più a lungo (McGarry et al, 2003). E' pertanto comprensibile come il contatto diretto tra bovino e cane non sia il punto chiave del mantenimento del ciclo epidemiologico della malattia.

I cuccioli sono più frequentemente escretori rispetto agli adulti, perciò è sconsigliabile ammettere cucciolate all'interno dell'allevamento (McAllister, 2016).

- ✓ Il bovino è il principale ospite intermedio e la trasmissione verticale (madre-feto) rappresenta un'importante modalità di infezione per le vitelle (Bjorkman et al., 1996; Pare, 1996). La trasmissione verticale è stata distinta in due tipi (Trees & Williams, 2005):
    - trasmissione **transplacentare esogena**, quando l'infezione colpisce la bovina durante la gravidanza e si trasmette direttamente al feto attraverso la placenta
    - trasmissione **transplacentare endogena**, quando la bovina è infetta in modo latente prima della fecondazione (infettata in modo congenito o per via orizzontale) e c'è riattivazione dell'infezione, che avviene generalmente durante l'ultimo trimestre di gravidanza

Questa distinzione sembra sia importante per prevedere la futura produttività della bovina, in quanto la trasmissione endogena predisporrebbe maggiormente ad aborti ripetuti, o a ripetute trasmissioni congenite di infezione in vitelli vitali (McAllister, 2016).

Diversi autori hanno cercato di stimare l'efficienza di trasmissione della trasmissione trasnplacentare endogena, con stime comprese tra il 40% (Schares et al, 1999; Moré et al, 2009) e il 95% (Paré et al, 1996; Schares et al, 1998; Haddad et al., 2005). Sono stati applicati fattori di correzione in quanto gli studi, condotti su popolazioni bovine naturalmente infette, hanno evidenziato la compresenza di infezioni avvenute per via orizzontale. Bartels et al (2007) ha stimato un'efficienza del 45% con una correzione del dato grezzo di partenza del 62%.

La neosporosi non si trasmette per contatto diretto. Sono state ipotizzate altre vie di trasmissione, ma nessuna di queste risulta importante da un punto di vista epidemiologico: la trasmissione con il colostro è stata sospettata (Moswa et al, 2007), e dimostrata in via sperimentale; la trasmissione venerea è ritenuta improbabile (Osoro et al, 2009)

Oltre ai bovini, altre specie appaiono capaci di fungere da ospiti intermedi, tra queste vi sono i piccoli ruminanti, il cavallo, ruminanti selvatici (Dubey et al., 1999), alcuni roditori, lagomorfi e alcune specie aviarie (McGuire et al., 1999; Mcallister, 2016); queste specie, a loro volta, possono rappresentare una fonte di infezione per cani e canidi selvatici. Il ruolo della volpe come ospite definitivo è ancora da confermare, in quanto per questa specie è stata dimostrata l'eliminazione di oocisti in bassa carica ma manca la dimostrazione sperimentale del ciclo completo (Schares et al., 2002; Wapenaar et al., 2006; Constantin et al., 2011).

Sommario

1. **La neosporosi può trasmettersi attraverso:**
   - ✓ **via orizzontale: ingestione di oocisti sporulate da parte delle bovine non gravide, con possibile infezione latente**
   - ✓ **via verticale esogena: ingestione di oocisti sporulate da parte di bovine gravide, con possibile aborto o trasmissione al vitello**
   - ✓ **via verticale endogena: infezione latente della bovina (per infezione congenita o per precedente infezione orizzontale) e riattivazione dell'infezione durante la gravidanza, con aborto o nascita di vitello infetto in modo congenito**

2. **Le oocisti sono molto resistenti nell'ambiente, pertanto possono essere introdotte in allevamento con l'alimento o l'acqua di abbeverata; non è necessaria la presenza del cane in allevamento**

3. **La trasmissione orizzontale e verticale sono complementari e rendono difficile il controllo dell'infezione**

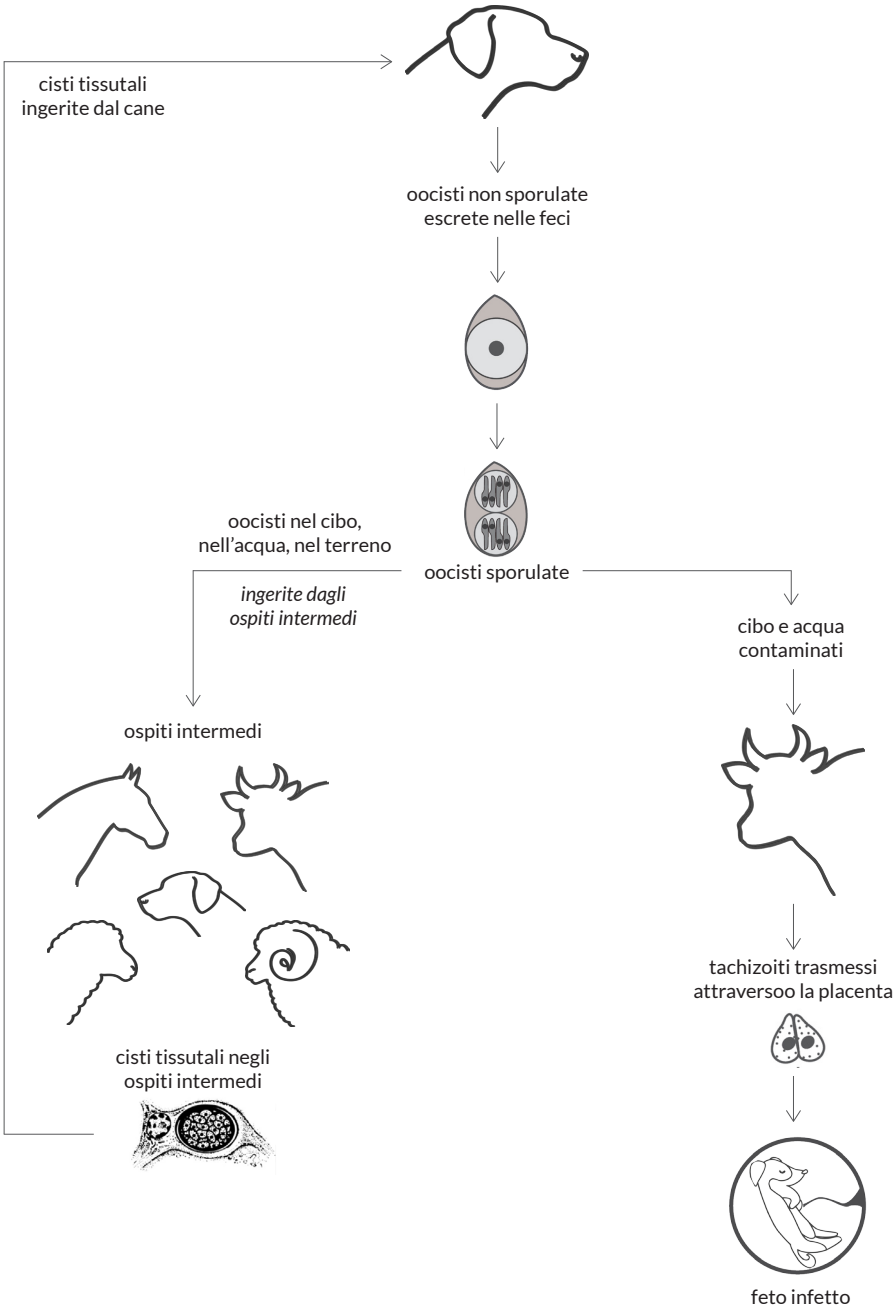


Figura 1: Ciclo biologico di ***Neospora caninum*** (rielaborazione da Dubey et al., 2003)

2. Descrizione della forma clinica

2. Descrizione della forma clinica

La Neosporosi è un'infezione che si manifesta nel bovino **adulto** unicamente con la patologia abortiva o natimortalità. L'aborto può avvenire in qualunque momento della gravidanza, dai 3 mesi al termine, ma più spesso si manifesta tra il 5° e il 7° mese (Dubey et al, 2006).

In caso di infezione trasmissione transplacentare esogena l'infezione può esitare in aborto circa 6 settimane post-infezione (Gondim et al, 2004; McCann et al, 2007).

Gli aborti possono essere ripetuti o isolati. Alcuni autori avevano ipotizzato un'influenza negativa dell'infezione sulla produzione di latte (Thurmond & Vietala, 1996-1997), ma la maggior parte degli studi è concorde nel sostenere che il danno economico relativo alla produzione di latte sia legato esclusivamente alla mancata lattazione che fa seguito all'evento abortivo (Hobson et al, 2002; Haddad et al., 2005; Bartels, et al, 2006).

A seconda dello stato di avanzamento della gravidanza, il feto può morire in utero ed essere riassorbito, essere mummificato o andare in autolisi. Si può palesare natimortalità, talvolta i vitelli possono nascere disvitali, o in rari casi possono manifestare sintomi neurologici. I segni clinici che si possono osservare in **vitelli** infetti sono prevalentemente di tipo neurologico, con flessione o iperestensione degli arti, diminuzione del riflesso patellare, esoftalmo e, più raramente, idrocefalo. Oppure i segni possono essere più aspecifici: debolezza, peso inferiore alla media, scarsa vitalità. Infine, il vitello può nascere apparentemente sano ma cronicamente infetto (Williams et al., 2000; Innes et al., 2002; Gondim et al, 2004).

Nel cane la malattia può avere manifestazioni cliniche più evidenti, soprattutto nei cuccioli, ma anche in questa specie l'infezione è più spesso asintomatica. La malattia si manifesta con sintomatologia prevalentemente neuromuscolare, tipicamente nei cuccioli, con morte neonatale, comparsa di sintomi subito dopo la nascita o settimane/mesi dopo (di solito entro i 6 mesi di età), talvolta a seguito di immunodepressione. I danni neurologici possono causare una neuropatia periferica con paralisi ascendente degli arti posteriori e atassia. La progressione della patologia porta ad atrofia muscolare, contratture e possibile iperestensione rigida dell'arto coinvolto. Sebbene la patologia sia tipica del cucciolo, sono segnalati casi clinici anche in cani adulti, fino a 15 anni di età. Negli adulti si possono notare segni neurologici da lesioni multifocali del SNC e miopatie infiammatorie. Sono segnalate anche sintomatologie atipiche: tosse; atassia da atrofia cerebellare; disfagia; dermatite nodulare e/o ulcerativa; polmonite; epatite; megaesofago associato a miosite esofagea. L'evoluzione più grave prevede il coinvolgimento del miocardio, con conseguenze letali. Non è noto se la malattia in cani adulti sia dovuta a infezione primaria o a esacerbazione di un'infezione cronica. La somministrazione di glicocorticoidi e altri farmaci immunosoppressivi, così come vaccini attenuati, possono riattivare i bradizoiti causando malattia clinica (Lyon, 2010).

3. Lesioni anatomo-patologiche

3. Lesioni anatomo-patologiche

Le lesioni anatomo-patologiche sono da riferirsi a feti abortiti e vitelli disvitali.

I feti abortiti possono essere mummificati o autolitici e le conseguenti alterazioni subite dai tessuti possono rendere difficoltosa la diagnosi diretta, con esiti falsamente negativi.

Anche se la mummificazione del feto è considerata un segno piuttosto frequente in caso di neosporosi, non vi sono aspetti peculiari rilevabili all'esame anatomo-patologico che possano confermare con certezza la diagnosi.

I feti nati morti o disvitali possono presentare segni neurologici, esoftalmo e più raramente idrocefalia (v. segni clinici).

Istologicamente si possono osservare lesioni infiammatorie di tipo necrotico non suppurativo soprattutto nel cervello, ma anche nel cuore, nella muscolatura striata e nel fegato. Per una conferma diagnostica occorre l'esame immunoistochimico del cervello, ma la metodica, oltre a risentire di lesioni autolitiche e della mummificazione, è poco sensibile in quanto le lesioni sono focali e non si localizzano in specifiche regioni, in cui sia possibile andarle a cercare. Nel cuore fetale le lesioni tendono a essere più diffuse a livello istologico, per cui l'esame di questo organo può essere utile.

4. Patogenesi

4. Patogenesi

L'infezione del bovino può avvenire per via orizzontale (ingestione di oocisti tramite l'alimento o l'acqua contaminati) o per via verticale (trasmissione transplacentare dalla madre al feto).

Per la trasmissione verticale sono state distinte due diverse situazioni (Trees & Williams, 2005):

- ✓ la via transplacentare esogena, quando la madre si infetta durante la gravidanza e l'infezione viene trasmessa direttamente al feto; questa modalità di infezione può esitare in aborto o nella nascita di un vitello infetto, ma è raro che queste bovine trasmettano l'infezione in future gestazioni (Dubey et al., 1996; Bartels et al., 2007; Dijkstra et al., 2008)
- ✓ la via transplacentare endogena, quando la madre si è infettata prima della gravidanza (per via verticale o orizzontale) e la trasmissione al feto avviene per riattivazione dell'infezione durante la gravidanza

Quando l'infezione avviene per via orizzontale in una bovina non gravida, questa può entrare in fase di infezione latente, con riattivazione durante la gravidanza, oppure può dare vita a vitelli sani e sieronegativi (Williams et al., 2000; Innes et al, 2001; Pereira et al, 2014). Ciò suggerisce che gli animali infettati per via orizzontale possano guarire dall'infezione e sviluppare un'immunità protettiva.

Diversamente, gli animali infettati in utero per via endogena restano persistentemente infetti e possono trasmettere l'infezione alla progenie (Barr et al., 1993; Anderson et al., 1995; Thurmond et al. 1997; Wouda et al., 1998). E' noto che il rischio di aborto diminuisce nelle gravidanze successive, quindi sembra che anche l'animale persistentemente infetto sia in grado di sviluppare un certo grado di immunità (Thurmond et al. 1997; Romero et al., 2002; Dijkstra et al, 2003).

In uno studio di campo è stato evidenziato che bovine già infette avevano minori probabilità di abortire rispetto ad animali esposti ad infezione primaria (McAllister et al., 2000). Williams et al (2003) ha dimostrato, in animali naturalmente infetti, che in bovine cronicamente infette la riposta immunitaria era protettiva verso una nuova infezione per via orizzontale, ma non verso la riattivazione dell'infezione latente.

A seconda del periodo di sviluppo embrionale o fetale al momento dell'infezione, l'esito della stessa si manifesta diversamente.

- ✓ primo periodo (fino a 3 mesi): l'infezione può dare riassorbimento, aborto,

mummificazione, o nessun esito. L'infezione non è trasmessa per via verticale. Dai pochi dati disponibili di infezioni sperimentali emerge che su 7 vacche infettate, seppure ad alte dosi (70000 oocisti), non è stato registrato nessun caso di infezione transplacentare (McAllister, 2016; Trees et al, 2002; Gondim et al, 2004; McCann et al, 2007)

- ✓ secondo periodo (4-7 mesi): l'esito dell'infezione è variabile, ma più spesso si manifesta la patologia abortiva (Benavides et al., 2014; dati di infezione sperimentale riportano che su 9 vacche infettate tra i 120 e i 130 giorni di gestazione, 6 hanno partorito vitelli non infetti e in 3 casi vi è stata infezione transplacentare, con 2 aborti (39-44 giorni post-infezione) e 1 nato morto. Altre 7 vacche sono state infettate tra il 6° e il 7° mese, con passaggio transplacentare in 6 casi su 7 e nascita di vitelli sani e congenitamente infetti. In questi casi è stata sufficiente una dose infettante di 127 oocisti (McAllister, 2016; Trees et al, 2002; Gondim et al, 2004; McCann et al, 2007)
- ✓ terzo periodo (8-9 mesi): possibile nascita di un vitello apparentemente sano ma infetto (Dubey et al, 2006; Williams et al., 2000)

Il meccanismo responsabile della morte fetale non è ancora stato completamente spiegato (Horcajo et al, 2016), ma le variazioni della risposta immunitaria della bovina durante la gestazione possono aiutare a capire la patogenesi dell'infezione.

Classicamente, il paradigma dell'immunomodulazione durante la gravidanza è stato basato sull'equilibrio Th1/Th2, con predilezione verso una riposta di tipo Th2 (Wegmann et al, 1993). Nuovi studi hanno esteso il paradigma a un equilibrio Th1/Th2/Th17 e Treg, in cui l'ormone progesterone ha un ruolo primario (Saito et al, 2010; Schumacher et al, 2014). Il progesterone ha un incremento repentino tra la prima fase di gestazione e la fase mediana, inibendo l'espressione delle citochine pro-infiammatorie IFN-gamma e IL-17, ma aumentando l'espressione della IL-4 (Maeda et al., 2013; Ohtsuka et al, 2009). Diversamente dagli studi condotti su uomo e topo, non è stato dimostrato nella bovina un ruolo del progesterone sulle cellule Treg (Maeda et al., 2013), risultandone una risposta più Th2-condizionata (Maeda et al., 2013; Ohtsuka et al, 2009; Druckmann & Druckmann, 2005).

La conoscenza sulla risposta immunitaria protettiva verso *Neospora caninum* nel bovino è ancora molto limitata ma, similmente ad altri patogeni intracellulari, la risposta cellulo-mediata, basata su T-cells CD4+ e citochine pro-infiammatorie quali gamma-IFN potrebbero svolgere un ruolo primario (Williams et al, 2000; Andrianarivo et al, 2001; Rosbottom et al, 2007). E' poco conosciuto anche il meccanismo di recrudescenza dell'infezione, con conversione del parassita da bradizoita a tachizoita, probabilmente anch'esso connesso a uno spostamento da risposta di tipo Th1 a Th2 (Horcajo et al, 2016). La riattivazione spiega anche il rialzo dei titoli anticorpali che si verifica tra metà e fine gestazione (Andrianarivo et al, 2005; Nogareda et al, 2007).

Oltre alla risposta immunitaria sistemica, l'espressione delle citochine Th2 (IL-4) e regolatorie (IL-10 e TGF-beta) a livello dell'interfaccia materno-fetale è cruciale per evitare il rigetto del feto (Entrican, 2002). L'infezione stimola una risposta infiammatoria che rompe l'equilibrio dell'interfaccia materno-fetale e può essere causa di aborto (Entrican, 2002; Almeria et al., 2003).

Per la patogenesi della Neosporosi è stata anche considerata l'ipotesi dell'immunotolleranza: il fatto che l'infezione del feto abbia diverse finestre di suscettibilità e la possibilità di nascita di vitelli infetti da vacche sieronegative ha fatto nascere l'ipotesi di una tolleranza immunitaria conseguente ad infezione congenita precedente allo sviluppo della risposta immunitaria fetale. Diversi studi sono stati effettuati (Anderson et al, 2000; Sager et al, 2001; McInnes et al, 2006), ma ad oggi non vi sono dimostrazioni in merito.

4.1 Patogenicità dei diversi ceppi e loro tipizzazione

Negli ultimi anni è stata scoperta una variabilità genetica e fenotipica tra diversi ceppi di *Neospora caninum*, con notevoli differenze di patogenicità e virulenza tra i diversi isolati, dimostrati in infezioni sperimentali (Horcajo et al., 2016). Alcuni isolati sono stati classificati a bassa virulenza a causa della scarsa capacità di creare danno fetale (Rojo-Montejoet al., 2009; Chryssafidis et al., 2014), altri sono stati considerati a moderata (Nc-1) o ad alta (Nc-Spain7 o Nc-Liv) virulenza a causa dell'alto tasso di mortalità fetale (Regidor-Cerrillo et al., 2014; Chryssafidis et al., 2014; Caspe et al., 2012).

5. Epidemiologia

5. Epidemiologia

Dal punto di vista epidemiologico vi sono alcuni aspetti che meritano un approfondimento, in quanto importanti per impostare piani aziendali di controllo:

1. vie di escrezione e trasmissione del microrganismo
2. sopravvivenza nell'ambiente
3. recettività degli animali all'infezione
4. introduzione dell'infezione in allevamento
5. fattori di rischio che intervengono nella diffusione dell'infezione in allevamento

5.1 Vie di escrezione e trasmissione del microrganismo

E' noto che la neosporosi non si trasmette da bovina a bovina per contatto diretto. L'infezione è mantenuta in allevamento attraverso:

- ✓ trasmissione verticale dalla vacca al feto
- ✓ trasmissione orizzontale attraverso ingestione di oocisti presenti nell'ambiente
- ✓ contagio del cane attraverso l'ingestione di placente e feti abortiti

La trasmissione verticale, in particolare la via transplacentare endogena, porta a una situazione di endemia, con un tasso di aborti costante nel tempo. Diversi autori hanno cercato di stimare l'efficienza di trasmissione della trasmissione trasnplacentare endogena, con stime comprese tra il 40% (Schares et al, 1999; Moré et al, 2009) e il 95% (Paré et al, 1996; Schares et al, 1998; Haddad et al., 2005; Hall et al, 2009). Sono stati applicati fattori di correzione poiché gli studi, condotti su popolazioni bovine naturalmente infette, hanno evidenziato la presenza simultanea di infezioni avvenute per via orizzontale. Bartels et al (2007) ha stimato un'efficienza del 45% con una correzione del dato grezzo di partenza del 62%.

La trasmissione orizzontale si manifesta in modo epidemico, con la cosiddetta "tempesta di aborti" nelle vacche che al momento dell'infezione erano al 4°-7° mese di gestazione. Possono abortire fino al 20-30% delle bovine gravide. La fonte di infezione è spesso difficilmente identificabile, ma talvolta le evidenze epidemiologiche hanno permesso di scoprirla, ad esempio in casi in cui si sono infettati diversi gruppi di vacche che avevano frequentato lo stesso pascolo, oppure che avevano la stessa fonte di alimento (insilati, razioni miscelate, additivi, etc.) o di acqua di abbeverata.

La presenza di un animale sieropositivo in allevamento non è considerato un rischio di trasmissione dell'infezione fino al momento del parto o dell'aborto. Nel primo caso si ha un'alta probabilità di generare una prole infetta, nel secondo caso si ha il rischio di trasmissione dell'infezione ai cani attraverso l'ingestione da parte di questi del feto o gli invogli fetali.

La vacca sieropositiva che non abortisce al primo parto difficilmente lo farà in seguito. Viceversa l'animale che ha abortito è a maggior rischio di abortire nuovamente (Reichel et al, 2014), anche se il rischio diminuisce con il tempo (Dijkstra et al, 2003).

Recentemente è stata individuata la presenza di *Neospora caninum* in seme di toro congelato (Caetano da Silva et al., 2004). Lo studio è stato eseguito su paillettes di vari lotti di produzione, ottenute in momenti diversi, da 20 tori sieropositivi, naturalmente infetti da Neospora e 5 tori sieronegativi. Da questo studio è risultato che il 40% dei tori sieropositivi (8/20) aveva almeno una paillettes positiva, tuttavia non tutte le paiette esaminate degli 8 tori erano positive (14/180), il che può significare che il protozoo non è sempre presente o che a volte è presente a livelli sotto soglia e pertanto non rilevabile.

Le paillettes dei 5 tori sieronegativi sono invece risultate sempre negative.

Da questo studio si è evidenziata la presenza della frazione genica di *Neospora caninum* nello sperma bovino, in particolare nella componente cellulare, rispetto al liquido seminale, ma nonostante questa evidenza non si può affermare come possibile la trasmissione venerea. Già in passato era stata rilevata la presenza di *T. gondii* nel seme di tori sperimentalmente infetti (Scarpelli et al., 2001), ma la trasmissione venerea non è mai stata dimostrata (Osoro et al, 2009).

Il cane può essere sia ospite definitivo, sia intermedio, ma la sua importanza epidemiologica risiede nel ruolo di ospite definitivo del parassita, con emissione di oocisti nelle feci. Data la notevole resistenza ambientale delle oocisti, la presenza del cane in allevamento non è una condizione strettamente necessaria al completamento del ciclo vitale di Neospora. La durata dell'escrezione, anzi, è generalmente molto breve (<2 settimane) nel corso della vita del cane ed è più frequente nel cucciolo rispetto al cane adulto (Gondim et al, 2005). In uno studio del 2005, Schares et al. hanno identificato soltanto 7 cani escretori su 24000 esaminati. Questo dato è indicativo della scarsa correlazione diretta che esiste tra la presenza di un cane in allevamento e il mantenimento dell'infezione in allevamento.

5.2 Sopravvivenza nell'ambiente

I tachizoiti presenti nei tessuti dei feti abortiti e negli invogli fetali sono labili nell'ambiente esterno, pertanto costituiscono un rischio soltanto se ingeriti in tempi brevi dall'ospite definitivo (cane). Le forme di resistenza ambientale di Neospora sono rappresentate dalle oocisti emesse dal cane con le feci. Nonostante il periodo di emis-

sione nel cane sia molto limitato (circa 2 settimane nel corso della vita) e sia davvero improbabile trovare un cane escretore, la resistenza delle oocisti nell'ambiente (stimata in diversi mesi da Dubey, 2004) consente loro di raggiungere gli ospiti intermedi anche a lunga distanza spazio-temporale, ad esempio mediante la contaminazione del pascolo, dell'alimento o dell'acqua di abbeverata. In particolare le fonti di rischio sono rappresentate dall'alimento miscelato o da supplementi, che quando sono contaminati possono infettare in contemporanea un gran numero di animali, proprio a causa delle loro modalità di preparazione.

5.3 Recettività degli animali all'infezione

E' già stato descritta le recettività dell'embrione e nel feto durante lo sviluppo (v. patogenesi), con diverse conseguenza a livello individuale ed epidemiologico.

Per quanto riguarda l'adulto, la sensibilità all'infezione per via orizzontale dipende probabilmente da diversi fattori: risposta immunitaria individuale, genetica dell'animale, virulenza del ceppo e dose infettante (quest'ultima sembra essere meno importante). In ogni caso l'infezione nella bovina non gravida resta inapparente e si può manifestare solo durante una gravidanza successiva. L'infezione nell'animale in vita è rilevabile soltanto mediante la risposta sierologica, che tuttavia non è del tutto predittiva sulle successive manifestazioni abortive.

5.4 Introduzione dell'infezione in allevamento e fattori di rischio

L'infezione può giungere in allevamento nei seguenti modi:

a. Emissione di oocisti da parte di cani infetti

   E' necessario prevenire il rischio di infezione nel cane evitando l'accesso alle zone parto e quindi l'ingestione delle placente di bovine infette. La bibliografia scientifica non prescrive in assoluto il divieto di accesso dei cani in allevamento, anzi in alcuni studi la presenza di un cane aziendale risulta protettivo, probabilmente in quanto limita l'accesso ai soggetti vaganti. E' tuttavia consigliato limitare il numero dei soggetti presenti, evitare la nascita di cucciolate in allevamento (i cuccioli sono più frequentemente escretori) e soprattutto evitare l'accesso a cani vaganti.

   Inoltre è strategico proteggere gli insilati, tutte le fonti alimentari e l'acqua di abbeverata da ogni possibile contaminazione fecale da parte dei cani.

A I	Comportamento o intervento fortemente raccomandato in base a più studi clinici randomizzati e controllati, o revisioni sistematiche

b. Introduzione in azienda di una o più bovine infette e trasmissione verticale

Non esistono prescrizioni ufficiali per il controllo della neosporosi nelle compravendite di animali, perciò è possibile introdurre l'infezione in allevamento con l'acquisto di animali, che potranno infettare a loro volta la prole per via verticale o contagiare il cane aziendale al momento del parto o dell'aborto, se questo ha accesso alla zona parto.

Per minimizzare questo rischio è consigliabile:

- ✓ evitare l'acquisto di manze o vacche, privilegiando la rimonta interna
- ✓ acquistare da aziende negative che effettuano un piano di controllo per neosporosi
- ✓ richiedere un test sierologico sugli animali che si vogliono acquistare, pur sapendo che, seppur raramente, esiste la possibilità di trovare soggetti infetti sieronegativi. Per aumentare la sensibilità del test è utile sottoporre a test nuovamente l'animale nel corso della gravidanza, sapendo che i livelli anticorpali aumentano a fine gravidanza

A I	Comportamento o intervento fortemente raccomandato in base a più studi clinici randomizzati e controllati, o revisioni sistematiche

c. Contaminazione dell'acqua di abbeverata o introduzione di alimento contaminato

Non c'è modo di garantire che l'alimento acquistato sia indenne da contaminazione. Questo pertanto resta il fattore più critico per il controllo dell'infezione in allevamento.

Attraverso le misure di controllo (v. biocontenimento) è possibile ridurre drasticamente la prevalenza d'infezione, ma il rischio non controllabile di una nuova introduzione per via orizzontale fa sì che molti ricercatori consiglino la "do nothing option".

d. Contaminazione del pascolo

La contaminazione del pascolo può avvenire da parte di cani vaganti, lupi (le volpi, ad oggi, sono soltanto sospette). Il pascolo promiscuo con altri bovini non costituisce un fattore di rischio.

In caso l'infezione sia contratta al pascolo per via orizzontale, l'incidenza non sarà alta come quella causata da un alimento miscelato contaminato. Il pascolo perciò, pur essendo un fattore di rischio, non espone a un'infezione di massa.

Rischio	Fattore di rischio	Importanza	Strategia di controllo
Ingestione di oocisti	Presenza di cani in allevamento	Alta	• No accesso cani alla zona parto • No ingresso di cani estranei • No cucciolate in allevamento • Copertura insilati
	Contaminazione fecale indiretta su alimento o acqua	Alta	Non controllabile su alimento acquistato dall'esterno
	Contaminazione pascolo	Alta	Non controllabile
Introduzione di animali infetti	Si	Alta	• Test sierologico in ingresso e a fine gravidanza • Introduzione da allevamenti "sicuri" (v. biosicurezza)
Fecondazione naturale e artificiale	Sospetta, non dimostrata	Scarsa	Non necessaria
Colostro	Dimostrata solo in via sperimentale	Scarsa	Non necessaria (colostro di madri negative)

Tabella 2: Analisi del rischio di ingresso dell'infezione in allevamento

6. Diagnosi

6. Diagnosi

Le capacità diagnostiche per la neosporosi bovina si basano attualmente sulla diagnosi diretta di infezione nel feto abortito e sulla diagnosi indiretta nell'animale adulto.

Oltre alle performances e all'affidabilità dei test diagnostici disponibili sul mercato, è necessario considerare come combinare al meglio, in termini di tempistica, economicità ed efficacia la raccolta dei campioni da sottoporre a indagini diagnostiche.

In particolare occorre decidere:

- ✓ quanti animali campionare
- ✓ quali animali campionare
- ✓ in che tempi
- ✓ come prelevare i campioni e come conservarli prima di conferirli al laboratorio
- ✓ tipologia di test

Il latte, il colostro e le feci possono essere impiegati per la ricerca dell'agente eziologico ma la diagnosi di malattia a partire da questi materiali biologici è meno affidabile ed il loro utilizzo è utile sopratutto per rilevare la circolazione dell'agente eziologico nella mandria o per studi epidemiologici (Sidi-Boumedine et al., 2010; Guatteo et al., 2006; Garcia-Ispierto et al., 2013; OIE, 2015).

Test diagnostici sierologici

Per la diagnosi indiretta le tecniche diagnostiche utilizzate sono: ELISA, ELISA con avidity test, IFAT.

In commercio sono disponibili una decina di kit ELISA commerciali, di cui uno solo di tipo competitivo, mentre gli altri sono di tipo non competitivo. Alcuni di questi si basano su anticorpi multispecie, altri sono utilizzabili soltanto per la specie bovina. In genere tutti i test ELISA hanno prestazioni soddisfacenti e confrontabili fra loro, con alcune eccezioni (Alvarez-Garcia et al., 2013). La sensibilità dei kit ELISA su siero di sangue è superiore al 95% e la specificità è superiore al 97%. (Haddad et al., 2005).

Sono stati segnalati possibili cross-reattività con *Besnoitia besnoiti* e con *Sarcocystis spp.* (Alvarez-Garcia et al., 2013).

Un'ulteriore possibilità diagnostica è offerta dall'Avidity test, finalizzati a differenziare le infezioni acute (bassi livelli di avidity IgG) da quelle croniche (alti livelli di avidity

IgG). Questi test risultano tuttavia complessivamente meno robusti dell'ELISA tradizionale (Bjorkman et al., 2006).

Il test di immunofluorescenza indiretta (IFAT) è un test più datato o meno utilizzato in quanto più laborioso e meno standardizzabile rispetto ai kit ELISA. Questo test offre tuttavia la possibilità di esprimere un titolo anticorpale, perciò talvolta può essere utile come test di conferma in caso di dubbi interpretativi al test ELISA. Titoli superiori a 1:1600 possono essere utilizzati a sostegno di una diagnosi di aborto (McAllister, 2016).

E' noto che gli anticorpi anti-neospora subiscono fluttuazioni durante il ciclo riproduttivo, perciò sono segnalati casi di bovine con esiti di positività altalenante (Guido et al, 2016). Per ovviare questo problema, si consiglia di testare gli animali nella seconda metà della gestazione, periodo in cui i titoli anticorpali raggiungono il picco.

Oltre all'esame su siero, i kit ELISA sono spesso progettati anche per la diagnosi su latte, individuale o di massa. Gli anticorpi nel latte compaiono più tardivamente e sono circa 30 volte meno concentrati (Guido et al., 2016), perciò la sensibilità su latte di massa è limitata (compresa tra 47 e 61%), mentre la specificità è stata stimata tra il 92 e il 94% (Bartels et al., 2005).

Si considera che all'interno del pool di latte devono essere presenti almeno 10-15% di animali sieropositivi affinché il campione di latte risulti positivo (Guido et al., 2016; Nardelli et al., 2005). Il latte di massa costituisce comunque un campione facile da prelevare e l'analisi è poco costosa, pertanto un'indagine di questo tipo può essere utile a livello di screening conoscitivo.

Test diagnostici diretti

La diagnosi diretta può essere ottenuta mediante tecniche immunoistochimiche o mediante tecniche molecolari, ma non è possibile praticarla sull'animale vivo.

Attualmente la diagnosi mediante PCR su organi fetali è senz'altro le più diffusa, offrendo una diagnosi rapida con un alto livello di sensibilità.

La PCR può risultare falsamente negativa in caso di autolisi del feto o mummificazione; un risultato positivo è da considerarsi una prova della presenza di infezione, ma vanno considerate anche le diagnosi differenziali. E' necessario ricordare che infezione da Neospora non è sempre causa di aborto, perciò la rilevazione di DNA nel feto abortito potrebbe essere un rilievo accidentale.

Per quanto riguarda la diagnosi di neosporosi nel cane, è stato utilizzato un kit ELISA competitivo (Capelli et al., 2004) per evidenziare la sieropositività nel cane. La Sensibilità e la Specificità del test su sieri di cane erano pari a 91.4% e 99.4%, rispettivamente, anche se la comparazione di questo test con una tecnica di immunofluorescenza ha dato scarsa concordanza, specialmente nei casi in cui si avevano bassi titoli anticorpali,

Informazioni	Test	Età degli animali	Conservazione	Valutazione esito
Screening di allevamento	ELISA su latte di massa	Tutti gli animali in lattazione	Latte refrigerato entro 24 h o adiuvato di sodio azide o conservante equivalente, entro 7 gg	Se positivo: significa che più del 15% degli animali testati sono sieropositivi
Piano di controllo/ monitoraggio	ELISA su siero	Superiore a 6 mesi	Siero refrigerato, consegnare entro 7 gg	Stima di sieroprevalenza aziendale
Valutazione del singolo caso di aborto	PCR su cervello feto + ELISA su sioero madre	Qualsiasi	• Siero refrigerato, consegnare entro 7 gg • Cervello feto refrigerato entro 24 h o congelato	Siero della madre positivo e PCR su feto positiva: si conferma la trasmissione verticale
Diagnosi di evento abortivo in azienda	ELISA su 10 vacche con aborto + 10 di controllo	Qualsiasi	Siero refrigerato, consegnare entro 7 gg	Valutare differenze tra i due gruppi
Verifica dello stato sierologico del singolo individuo	ELISA su siero	Qualsiasi, possibilmente da valutare nella seconda metà della gravidanza	Siero refrigerato, consegnare entro 7 gg	Positivo o negativo

Tabella 3: Procedure diagnostiche raccomandate

situazione che probabilmente è la più frequente nella popolazione canina. L'indagine è stata eseguita su sieri di cane prelevati in tre province del Nord-Est (Trento, Verona e Rovigo). I risultati dell'indagine ha evidenziato che il 10,9% dei cani aveva anticorpi nei confronti di *Neospora caninum*. I metodi di diagnosi diretta disponibili sull'ospite definitivo (cane) sono rappresentati dall'esame coprologico delle feci, seguito da analisi biomolecolare in caso di positività per confermare la presenza di Neospora, visto che le oocisti sono praticamente indistinguibili da altri coccidi che colpiscono il cane. La metodica ha però evidenti limiti oggettivi, infatti solo in pochi casi sono state messe in evidenza oocisti da feci di animali naturalmente infetti (McGarry et al., 2003; Schares et al., 2005), inoltre poco è conosciuto sulla frequenza e durata dell'escrezione di queste oocisti con le feci.

Raccomandazioni per l'esecuzione di test diagnostici su ospite bovino:

1. **per eseguire indagini di sorveglianza e monitoraggio in allevamenti presenti sul territorio, è consigliato:**
    a. **test sierologici su latte di massa**
    b. **test individuali da siero di sangue su tutto l'effettivo o su un campione statisticamente rappresentativo di animali**

c. **indagini costanti su tutti i feti abortiti, secondo quanto proposto dalla LG*in*Vet1**

2. **per conoscere lo stato sanitario di un animale, è consigliato:**
   a. **test sierologico individuale su siero di sangue**

A IV	Comportamento o intervento fortemente raccomandato In base a studi caso controllo

Raccomandazioni per l'esecuzione di test diagnostici su cane:

a. **l'esame coprologico ha scarsa efficacia**

C IV	Comportamento o intervento da considerare, ma di impatto incerto sulla base di studi caso-controllo

b. **l'esame sierologico con metodo ELISA ha una buona attendibilità diagnostica**

B IV	Comportamento o intervento raccomandato sulla base di studi caso-controllo

6.1 Prelievo, conservazione e trasporto del campione

1. Siero o sangue non coagulato per ricerca anticorpi: refrigerato, consegnare al laboratorio entro 7 gg
2. Feto abortito: refrigerato, consegnare al laboratorio entro 24 h, oppure congelare
3. Latte individuale o di massa: refrigerato, consegnare al laboratorio entro 24 h, oppure aggiungere conservante (sodio azide o equivalenti). Non congelare

6.2 Fattori analitici

Per ottenere il giusto riconoscimento di fronte alla comunità professionale un laboratorio deve perseguire la politica della qualità attraverso:

- ✓ la conoscenza delle prestazioni dei test utilizzati
- ✓ il controllo della qualità di processo
- ✓ il controllo della qualità analitica e di efficacia della propria azione

La valutazione di un test non può prescindere dalla conoscenza delle prestazioni analitiche del test impiegato. A livello diagnostico la qualità analitica è importante anche se non è tutto, ma senza di essa il resto non è niente. I parametri importanti sono la sensibilità, la specificità, l'accuratezza e la precisione. La sensibilità rappresenta la probabilità che un animale infetto risulti positivo al test; la specificità, invece, rappresenta la probabilità che un animale non infetto risulti negativo al test. L'accuratezza è rappresentata dalla quantità di concordanza tra il valore ottenuto dall'analisi rispetto al valore atteso di un analita, misurata attraverso un campione standard a concentrazione nota. La precisione misura la dispersione dei risultati ottenuti in seguito a ripetute analisi di un campione. Un basso valore di dispersione indica che la metodica è precisa. La ripetitività e la riproducibilità sono valori che rivelano il grado di precisione di una metodica di analisi. La ripetibilità viene calcolata sulla base di due elementi: il grado di concordanza tra due, tre repliche di ogni campione eseguite durante la stessa seduta di esame e la concordanza dei valori normalizzati di ogni campione controllo ottenuta in giornate lavorative diverse. La riproducibilità è, invece, il valore di concordanza tra i risultati dei campioni analizzati in differenti laboratori. Un sistema di analisi può essere preciso, ma non accurato, se i risultati dell'analisi non concordano con i valori attesi dello standard. Ma non può essere accurato se non è anche preciso. Per soddisfare questi requisiti è necessario che il laboratorio utilizzi solo metodiche validate.

Un laboratorio che opera in qualità deve avere un controllo di processo. Deve pertanto operare secondo le norme ISO 17025. Le metodiche analitiche devono essere aderenti agli standard internazionali ed essere eseguite secondo procedure codificate. Inoltre, il laboratorio deve essere libero da pressioni indebite, commerciali, finanziarie e di altra natura, suscettibili di avere influenza negativa sui giudizi tecnici. Non deve intraprendere attività che possano compromettere la fiducia nella sua indipendenza di giudizio e nella sua integrità, in relazione alle sua attività di prova.

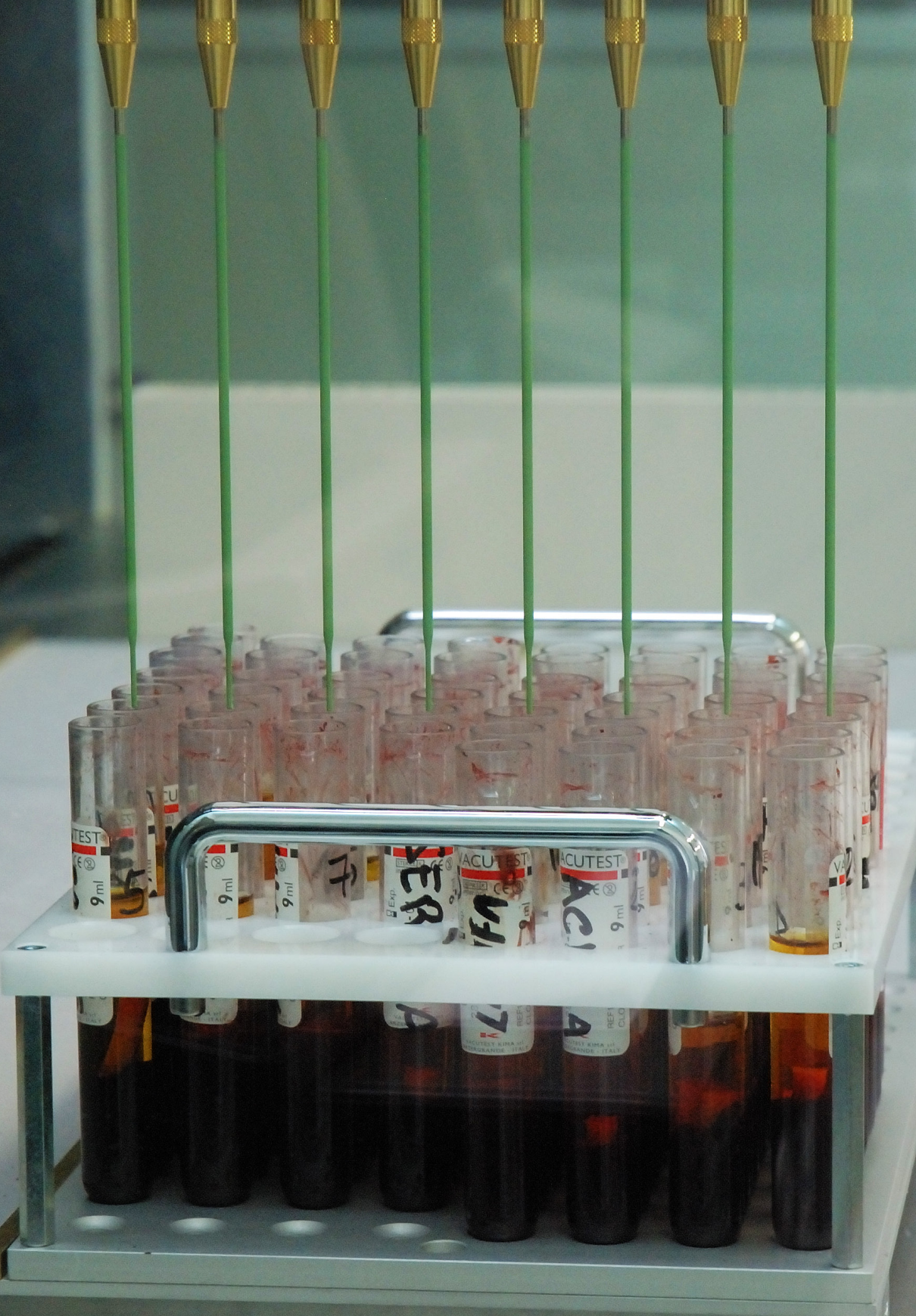
Infine, il laboratorio deve avere un controllo sulla qualità analitica e di efficacia della propria azione attraverso:

- ✓ l'esecuzione di periodici ring-trial (prove interlaboratorio) con centri di referenza pubblici e privati
- ✓ l'esecuzione di studi osservazionali o sperimentali, disegnati in modo da crea-

re "evidenze" che costituiscono la fonte per le decisioni cliniche o per la scelta delle politiche sanitarie

- ✓ trial-clinici per verificare l'efficacia delle azioni messe in atto

Per raggiungere questi obiettivi la moderna medicina di laboratorio deve fare un notevole sforzo per conoscere le prestazioni analitiche dei test impiegati, per eseguire una verifica interna ed esterna di qualità, infine per comprendere la potenza diagnostica degli esami effettuati, sia sul singolo caso clinico, sia nel monitoraggio su popolazioni di animali.


VACUTEST
6 ml

7. Interventi nelle aziende infette

7. Interventi nelle aziende infette

Prevenzione

Attualmente si ritiene che un bovino si possa infettare per via verticale (trasmissione per via uterina) o per via orizzontale, ingerendo le oocisti emesse dall'ospite definitivo (cane).

L'infezione, come visto al punto *5.4. Introduzione dell'infezione in allevamento e fattori di rischio*, può entrare in un allevamento indenne attraverso l'acquisto di una bovina infetta o l'ingestione di oocisti disseminate nell'ambiente. La neosporosi, poi, si mantiene e si diffonde per via verticale (trasmissione dell'infezione da madre a figlia) o orizzontale (contagio dei cani per ingestione di placente infette o feti abortiti), oppure può essere nuovamente introdotta dall'esterno, ad esempio tramite il fieno contaminato.

Si ritiene che le migliori misure di biosicurezza siano rappresentate da:

- ✓ rimonta interna
- ✓ istituzione di barriere fisiche che impediscano il contatto tra cani, alimenti per le bovine e le bovine stesse, soprattutto al momento del parto

Non sempre queste misure sono attuabili, in particolare la prima. Infatti le trasformazioni in atto in campo zootecnico spesso esigono l'espansione degli allevamenti e in questo caso l'allevatore, se non dispone di una sufficiente rimonta interna, deve necessariamente acquistare animali da altri allevamenti.

Biosicurezza

Se un allevamento non ha una rimonta sufficiente dovrebbe acquistare gli animali da allevamenti indenni, attualmente però non esistono piani di certificazione di allevamenti nei confronti di *Neospora caninum*. In assenza di allevamenti certificati si raccomanda di richiedere una verifica sullo stato sanitario dell'allevamento di provenienza dell'animale in compravendita (diagnosi di stalla).

Tale verifica può essere eseguita con due modalità:

1. eseguire l'esame sierologico individuale su un numero rappresentativo di animali adulti. Considerando una prevalenza attesa pari al 15%, il numero degli animali da testare varia da 15 soggetti, in un allevamento con 50 animali, a 18 soggetti, in un allevamento con 300 animali
2. eseguire un esame sierologico sul latte di massa degli animali in lattazione. Un singolo controllo dell'allevamento, mediante ricerca anticorpi su campioni di

latte di massa è poco affidabile ai fini della certificazione, in quanto con una prevalenza di infezione in allevamento del 15% e con i valori di sensibilità e specificità precedentemente indicati, il Valore Predittivo Negativo del test (probabilità che un campione negativo al test sia veramente negativo) è pari al 86%. In questa situazione abbiamo che il 14% di aziende pur essendo infette risultano negative al test

Risulta evidente che sulla base puramente statistica, il primo approccio fornisce indicazioni più solide sullo stato sanitario dell'allevamento e pertanto è da preferire, gli svantaggi sono rappresentati dal fatto che è più costoso e meno pratico del secondo.

In assenza di allevamenti certificati e nella necessità di acquistare animali si raccomanda una verifica dell'allevamento di provenienza, mediante un test ELISA su sangue, eseguito su un numero rappresentativo di animali adulti.

A IV	Comportamento o intervento fortemente raccomandato In base a studi caso controllo

Quarantena ed esecuzione del test sull'animale

Come già precisato una bovina è pericolosa in quanto può trasmettere l'infezione per via verticale alla propria prole, oppure perché il feto e gli invogli fetali, se ingeriti, possono infettare i cani presenti in azienda.

Al di fuori di queste due situazioni una bovina anche se sieropositiva non è pericolosa in quanto, al momento, non è dimostrata la trasmissione orizzontale tra ospiti intermedi.

Gli animali acquistati devono essere messi in quarantena e sottoposti a un test sierologico individuale su siero di sangue per ricerca anticorpi. In caso di parto o di aborto gli invogli e il feto devono essere immediatamente recuperati ed eliminati, in modo da evitare che i cani li ingeriscano.

Si raccomanda di eseguire un test sierologico individuale (ELISA) su tutti gli animali introdotti in allevamento e introdurre solo animali sieronegativi.

A I	Comportamento o intervento fortemente raccomandato in base a più studi clinici randomizzati e controllati, o revisioni sistematiche

Controllo ambientale

Considerando che, anche eseguendo test sierologici, è sempre possibile introdurre in allevamento un animale falsamente negativo, quindi infetto, è indispensabile minimizzare i fattori di rischio responsabili della trasmissione.

L'accesso dei cani negli spazi destinati al ricovero dei bovini e degli alimenti e alla vitellaia deve essere interdetto. Inoltre è necessario attivare un programma di monitoraggio per dimostrare che Neospora caninum non sia entrata in allevamento. Questo programma dovrebbe includere l'esame sierologico di tutte le vacche che abortiscono e la ricerca di *Neospora caninum* dai feti di vacche sieropositive mediante PCR (LGinVET1).

A I	Comportamento o intervento fortemente raccomandato in base a più studi clinici randomizzati e controllati, o revisioni sistematiche

Biocontenimento

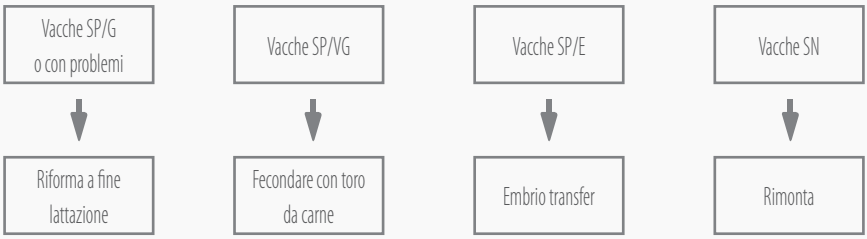
Il principale obiettivo per gli allevamenti infetti è rappresentato dalla prevenzione degli aborti e dalla riduzione della prevalenza dell'infezione.

Negli allevamenti infetti la prima operazione da eseguire è stabilire le dimensioni del problema. Per ottenere questa informazione è necessario stabilire la sieroprevalenza dell'infezione. Ciò è possibile attraverso l'esecuzione di test sierologici su tutta la mandria a partire da 6 mesi di età, in modo da eliminare i falsi positivi per anticorpi materni; registrare il numero di aborti e ricercare sistematicamente *Neospora caninum* (anticorpi ed antigene) sul sangue della madre e dai feti, secondo quanto suggerito dalla LGinVET1. Sulla base dell'esito dell'esame sierologico si decidono gli interventi sanitari da attuare.

In un piano di Biocontenimento è necessario controllare i seguenti fattori di rischio:

1. **limitare l'accesso dei cani nelle aree dove sono allevati i bovini, la vitellaia, e gli alimenti**
2. **coprire gli insilati e tutte le fonti alimentari**
3. **impedire che i cani possano ingerire la placenta espulsa da bovine che hanno partorito regolarmente e la placenta ed il feto di bovine che hanno abortito**
4. **portare al laboratorio diagnostico i feti abortiti secondo la procedura indicata da LGinVET1**

5. **eliminare le vacche sieropositive e non utilizzare manzette sieropositive per la rimonta**
6. **controllare le infezioni intercorrenti (BVDV, IBRV, Paratubercolosi, Febbre Q, Clamidiosi, Leptospirosi, etc. al fine di ridurre la sintomatologia abortiva**



SP = siero positive | SN = Siero negative
Genealogia: G = good | VG = very good | E = excellent

Scheda 1: gestione degli allevamenti infetti

Se in allevamento vi sono molti animali positivi e si ritiene opportuno mettere in atto un programma di controllo, vi sono diverse strategie possibili (Reichel et al., 2013; McAllister et al, 2016), quali ad esempio:

- ✓ fecondazione con toro da carne (maggior resistenza degli ibridi e non rimonta con vitelli positivi)
- ✓ eliminazione delle bovine positive, indipendentemente dallo stato sanitario delle madri
- ✓ embryo-transfer
- ✓ eliminazione delle figlie di bovina positiva, a tappeto o dopo test sierologico pre-colostro

In molte aziende a seguito dell'alta prevalenza dell'infezione nella mandria non è possibile eliminare in tempi brevi le bovine sieropositive, in quanto verrebbe a mancare il reddito dell'azienda e la rimonta. In questi casi è necessario programmare un piano a lungo termine, basato su questi punti:

1. eseguire un esame sierologico della mandria una volta all'anno
2. rimonta immediata degli animali sieropositivi, che hanno anche altre patologie o che sono scarsamente produttivi
3. stabilire la quota annua di rimonta. In questo calcolo si deve considerare: il numero di animali sieronegativi su cui fare affidamento per la rimonta e il numero di vitelle che potenzialmente possono nascere all'anno (metà dei parti/anno)

4. sulla base della quota di rimonta necessaria, stabilire la quota annuale di bovine sieropositive da ingravidare con tori da carne (questo permette di garantire la produzione per la lattazione successiva, ma di fatto esclude l'animale dalla rimonta)
5. per non perdere la rimonta di animali sieropositivi di elevato valore genetico è consigliato il ricorso all'embryo-transfer su riceventi rigorosamente sieronegative
6. eseguire il controllo sierologico delle vitelle da rimonta nate da madri sieronegative e sieropositive ed utilizzare solo animali sieronegativi:
    a. prima dell'assunzione del colostro (auspicabile anche se non sempre possibile)
    b. a 6 mesi (momento di scomparsa di eventuali anticorpi materni)
    c. a 15-18 mesi (prima della fecondazione)
7. ripetere annualmente l'esame sierologico della mandria ed eventualmente rimodulare il piano

L'embryo-transfer è una pratica ginecologica che, per quanto riguarda la Neospora, non presenta rischi, infatti gli embrioni prelevati da donatrici sieropositive ed impiantati su riceventi sieronegative, generano vitelle sieronegative.

Sebbene vari agenti antimicrobici siano stati testati per valutare la capacità in vitro nei confronti di *Neospora caninum* non ci sono evidenze su un'effettiva efficacia in vivo.

A I	Comportamento o intervento fortemente raccomandato in base a più studi clinici randomizzati e controllati, o revisioni sistematiche

8. Vaccinazione

8. Vaccinazione

Attualmente in Italia non esistono vaccini registrato nei confronti di Neospora. Negli Stati Uniti è stato disponibile un vaccino spento, ora ritirato dal commercio, costituito da tachizoiti inattivati, da utilizzare nelle prime fasi di gestazione. Da studi preliminari sembrava che il vaccino fosse in grado di ridurre l'incidenza di aborti (Choromanski & Block, 2000; Williams et al., 2003; Romero et al., 2004), tuttavia il ritiro dal commercio è dovuto all'insoddisfazione degli utilizzatori e alla mancata interruzione della trasmissione verticale.

Da diversi anni è allo studio un vaccino attenuato, sul modello di quello utilizzato con successo per *Toxoplasma gondii* in Nuova Zelanda (Buxton & Innes, 1995). Il nuovo vaccino ha fornito buoni risultati a livello sperimentale (Williams et al, 2007; Rojo-Montejo et al., 2013; Weber et al., 2013), ma non si prevede una commercializzazione a breve termine, a causa di difficoltà da superare riguardo a stabilità ed innocuità del vaccino.

Ad oggi la vaccinazione ha lo scopo di proteggere animali sieronegativi prima della gravidanza, evitando la trasmissione esogena e l'infezione orizzontale, ma ancora non ci sono dimostrazioni sulla prevenzione della trasmissione endogena a seguito di riattivazione (Reichel et al., 2015)

9. Ruolo come agente zoonosico

9. Ruolo come agente zoonosico

Neospora caninum è strettamente correlata filogeneticamente a *Toxoplasma gondii* e l'infezione è stata evidenziata in un ampio range di potenziali ospiti. Nel 1994 è stato dimostrato sperimentalmente che primati non umani sono sensibili a un'infezione transplacentale da Neospora (Barr et al., 1994). Per queste ragioni si è ipotizzato che questo protozoo potesse avere un ruolo come agente zoonosico. Ad oggi sono stati eseguiti sull'uomo solo due studi (Petersen et al., 1999; Tranas et al., 1999). Petersen ha eseguito uno studio retrospettivo su 76 donne con una storia recente di aborto mediante la ricerca di anticorpi nel siero, in nessuna delle pazienti è stato riscontrata la presenza di anticorpi. Tranas ha eseguito uno studio trasversale su 1.029 sieri per evidenziare il livello umano di esposizione a Neospora e ha trovato il 4,9% di sieri positivi per anticorpi. Sulla base di questi lavori si evidenzia la possibile esposizione dell'uomo nei confronti di questo protozoo (cosa abbastanza ovvia visto lo stretto rapporto esistente tra uomo e cane), ma ad oggi non sembra che Neospora sia causa di aborto nella donna. Inoltre in questi lavori non viene indicata l'accuratezza dei test utilizzati, pertanto sono di dubbia interpretazione. Infine c'è da segnalare che i lavori pubblicati sono pochi e oramai datati e dal 1999 ad oggi l'argomento non è stato più oggetto di studio.

Esiste qualche studio più recente che riporta positività sierologiche in persone immunodepresse (Lobato et al., 2006; Oshiro et al., 2015).

> BIBLIOGRAFIA CONSULTATA

> Bibliografia

1. *Almeria S, De Marez T, Dawson H, Araujo R, Dubey JP, Gasbarre LC. (2003) Cytokine gene expression in dams and foetuses after experimental Neospora caninum infection of heifers at 110 days of gestation. Parasite Immunol.;25(7):383-92*
2. *Alvarez-Garcia G., Garcia-Culebras A., Gutierrez-Exposito D., Navarro-Lozano V., Pastor-Fernandez I., Ortega-Mora L.M. (2013) Serological diagnosis of bovine neosporosis: a comparative stydy of commercially available ELISA tests. Vet. Paras., 198: 85-95*
3. *Anderson ML, Palmer CW, Thurmond MC, Picanso JP, Blanchard PC, Breitmeyer RE, Layton AW, McAllister M, Daft B, Kinde H, et al. (1995) Evaluation of abortions in cattle attributable to neosporosis in selected dairy herds in California.J Am Vet Med Assoc. 1995 Nov 1;207(9):1206-10*
4. *Anderson ML, Andrianarivo AG, Conrad PA. (2000) Neosporosis in cattle. Anim Reprod Sci. 2;60-61:417-31. Review*
5. *Andrianarivo AG, Barr BC, Anderson ML, Rowe JD, Packham AE, Sverlow KW, Conrad PA. (2001) Immune responses in pregnant cattle and bovine fetuses following experimental infection with Neospora caninum. Parasitol Res.;87(10):817-25*
6. *Andrianarivo AG, Anderson ML, Rowe JD, Gardner IA, Reynolds JP, Choromanski L, Conrad PA. (2005) Immune responses during pregnancy in heifers naturally infected with Neospora caninum with and without immunization. Parasitol Res.;96(1):24-31. Epub 2005 Mar 15*
7. *Asmare K, Regassa F, Robertson LJ, Skjerve E. (2013) Seroprevalence of Neospora caninum and associated risk factors in intensive or semi-intensively managed dairy and breeding cattle of Ethiopia. Vet Parasitol. 31;193(1-3):85-94. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.11.025*
8. *Barberio A. et al., (2006). Indagine sugli aborti infettivi della vacca da latte nella regione veneto J. of the Italian Association for Buiatrics. 1,(6):19-27*
9. *Barr BC, Conrad PA, Breitmeyer R, Sverlow K, Anderson ML, Reynolds J, Chauvet AE, Dubey JP, Ardans AA. (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.1;202(1):113-7*
10. *Barr B.C. et al., (1994). Experimental fetal and transplacental Neospora infection in nonhuman primate. Lab. Invest. 71(2):236-242*
11. *Bartels C.J.M. et al., (2005). Evalutation of three enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to Neospora caninum in bulk milk. Vet. Parasitol. 131:235-246*
12. *Bartels CJ, van Schaik G, Veldhuisen JP, van den Borne BH, 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.; 18;77(3-4):186-98

13. *Bartels CJ, Arnaiz-Seco JI, Ruiz-Santa-Quitera A, Björkman C, Frössling J, von Blumröder D, Conraths FJ, Schares G, van Maanen C, Wouda W, Ortega-Mora LM. (2006) Supranational comparison of Neospora caninum seroprevalences in cattle in Germany, The Netherlands, Spain and Sweden. Vet Parasitol.; 15;137(1-2):17-27*
14. *Bartels CJ, Huinink I, Beiboer ML, van Schaik G, Wouda W, Dijkstra T, Stegeman A. (2007) Quantification of vertical and horizontal transmission of Neospora caninum infection in Dutch dairy herds.Vet Parasitol.; 1;148(2):83-92*
15. *Benavides J, Collantes-Fernández E, Ferre I, Pérez V, Campero C, Mota R, Innes E, Ortega-Mora LM. (2014) Experimental ruminant models for bovine neosporosis: what is known and what is needed. Parasitology;141(11):1471-88. doi: 10.1017/S0031182014000638*
16. *Bjerkas I. et al., (1984). Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. Z Parasitenkd 70:271–274*
17. *Bjorkman C. et al., (1996). Neospora species infection in a herd of dairy cattle. JAVMA 208:1441-1443*
18. *Björkman C. et al (2006) Neospora caninum IgG avidity tests: an interlaboratory comparison. Vet Parasitol10;140(3-4):273-80. Epub 2006 Jun 5*
19. *Buxton D, Innes EA. (1995) A commercial vaccine for ovine toxoplasmosis. Parasitology;110 Suppl:S11-6. Review*
20. *Caetano da Silva A. et al., (2004). Occasional detection of Neospora caninum DNA in frozen extended semen from naturally infected bulls. Theriogenology 62:1329-1336*
21. *Capelli G. et al., (2004). Sero-epidemiological survey of Neospora caninum infection in dogs in North-eastern Italy. Vet Parasitol. 123:143-148*
22. *Cascone G., Vesco G., D'Orazi A., Lo Magno G., Currò V., Reale S., Caracappa S. (2002). Studio preliminare sulla sieroprevalenza da Neospora caninum in bovine da latte, Atti della Società Italiana di Buiatria, Vol. XXXIV, pp. 273-276*
23. *Caspe SG, Moore DP, Leunda MR, Cano DB, Lischinsky L, Regidor-Cerrillo J, Álvarez-García G, Echaide IG, Bacigalupe D, Ortega Mora LM, Odeón AC, Campero CM. (2012) The Neospora caninum-Spain 7 isolate induces placental damage, fetal death and abortion in cattle when inoculated in early gestation. Vet Parasitol. 26;189(2-4):171-81. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.04.034*
24. *Choromanski L. & Block W., (2000). Humoral immune responses and safety of experimental formulations of inactivated Neospora vaccines. Parasitol. Res. 86:851–853*
25. *Chryssafidis AL, Cantón G, Chianini F, Innes EA, Madureira EH, Gennari SM. (2014) Pathogenicity of Nc-Bahia and Nc-1 strains of Neospora caninum in experimental-*

ly infected cows and buffaloes in early pregnancy. Parasitol Res.;113(4):1521-8. doi: 10.1007/s00436-014-3796-x

26. *Constantin EM, Schares G, Grossmann E, Sauter K, Romig T, Hartmann S. (2011) Studies on the role of the red fox (Vulpes vulpes) as a potential definitive host of Neospora caninum. Berl Munch Tierarztl Wochenschr. 2011 Mar-Apr;124(3-4):148-53*
27. *Dijsktra T. et al., (2001). Dogs shed Neospora caninum oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but non after ingestion of colostrums spiked with Neospora caninum tachyzoites. Int. J. Parasitol.;31:747-752*
28. *Dijkstra T, Barkema HW, Eysker M, Beiboer ML, Wouda W. (2003) Evaluation of a single serological screening of dairy herds for Neospora caninum antibodies. Vet Parasitol. 2;110(3-4):161-9*
29. *Dijkstra T, Lam TJ, Bartels CJ, 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):220-5. doi: 10.1016/j.vetpar.2007.12.034. Epub 2008 Jan 8*
30. *Dubey JP, Lindsay DS. (1996) A review of Neospora caninum and neosporosis. Vet Parasitol. 2;67(1-2):1-59. Review*
31. *Dubey J.P. et al., (1999). High prevalence of antibodies to Neospora caninum in white tailed deer (Odocoileus virginianus). Int. J. Parasitol. 29:17091711*
32. *Dubey J.P. et al., (2003). Review of Neospora caninum and neosporosis in animals. Korean J. Parasitol. Mar;41(1):1-16*
33. *Dubey JP, Sreekumar C, Knickman E, Miska KB, Vianna MC, Kwok OC, Hill DE, Jenkins MC, Lindsay DS, Greene CE. (2004) Biologic, morphologic, and molecular characterisation of Neospora caninum isolates from littermate dogs. Int J Parasitol.;34(10):1157-67*
34. *Dubey JP, Lindsay DS. (2006) Neosporosis, toxoplasmosis, and sarcocystosis in ruminants. Vet Clin North Am Food Anim Pract.;22(3):645-71. Review*
35. *Druckmann R, Druckmann MA. (2005) Progesterone and the immunology of pregnancy J Steroid Biochem Mol Biol.;97(5):389-96. Epub 2005 Sep 29*
36. *Entrican G. (2002) Immune regulation during pregnancy and host-pathogen interactions in infectious abortion. J Comp Pathol. 2002;126(2-3):79-94. Review*
37. *Gennari SM, Rodrigues AA, Viana RB, Cardoso EC. (2005) Occurrence of anti-Neospora caninum antibodies in water buffaloes (Bubalus bubalis) from the Northern region of Brazil. Vet Parasitol. 25;134(1-2):169-71*
38. *Gondim LF, Gao L, McAllister MM. (2002) Improved production of Neospora caninum oocysts, cyclical oral transmission between dogs and cattle, and in vitro isolation from oocysts. J Parasitol.;88(6):1159-63*
39. *Gondim LF, McAllister MM, Anderson-Sprecher RC, Björkman C, Lock TF, Firkins LD,*

Gao L, Fischer WR. (2004) Transplacental transmission and abortion in cows administered Neospora caninum oocysts. J Parasitol. 90(6):1394-400

40. *Guarino A, Fusco G, Savini G, Di Francesco G, Cringoli G. (2000) Neosporosis in water buffalo (Bubalus bubalis) in Southern Italy. Vet Parasitol.; 24;91(1-2):15-21*
41. *Guido et al., (2016) Serology-based diagnostics for the control of bovine neosporosis. Trends in Parasitology, 32(2):131-143*
42. *Haddad J.P.A. et al., (2005). A review of Neospora caninum in dairy and beef cattle – a Canadia prospective. Can. Vet. J. 46:230-243*
43. *Hobson JC, Duffield TF, Kelton D, Lissemore K, Hietala SK, Leslie KE, McEwen B, Cramer G, Peregrine AS. (2002) Neospora caninum serostatus and milk production of Holstein cattle. J Am Vet Med Assoc. 15;221(8):1160-4*
44. *Horcajo P, Regidor-Cerrillo J, Aguado-Martínez A, Hemphill A, Ortega-Mora LM. (2016) Vaccines for bovine neosporosis: current status and key aspects for development. Parasite Immunol. 17. doi: 10.1111/pim.12342. [Epub ahead of print] Review*
45. *Innes EA, Wright SE, Maley S, Rae A, Schock A, Kirvar E, Bartley P, Hamilton C, Carey IM, Buxton D. (2001) Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. Int J Parasitol.;31(13):1523-34*
46. *Innes EA, Andrianarivo AG, Björkman C, Williams DJ, Conrad PA. (2002) Immune responses to Neospora caninum and prospects for vaccination. Trends Parasitol.;18(11):497-504. Review*
47. *Lindsay D.S. et al., (1999). Confirmation that the dog is a definitive host for Neospora caninum. Vet. Parasitol. 82:327-333*
48. *Lobato J, Silva DA, Mineo TW, Amaral JD, Segundo GR, Costa-Cruz JM, Ferreira MS, Borges AS, Mineo JR. (2006) 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., 13(1):84-9*
49. *Lyon C. (2010) Update on the diagnosis and management of Neospora caninum infections in dogs. Top Companion Anim Med. 2010 Aug;25(3):170-5. doi: 10.1053/j.tcam.2010.07.005*
50. *Maeda Y1, 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):43-9. doi: 10.1007/s11259-012-9545-7. Epub 2012 Nov 27*
51. *Magnino S., Bandi C., Vigo P.C., Bazzucchi I., De Giuli M., Fabbi M., Genchi C. (2001) La neosporosi del bovino: aggiornamento su unamalattia emergente L'Osservatorio, anno 4, n.1*
52. *Masala G, Vidili A, Spissu P, Mentisci P, Porcu R, Scala A (2000). Preliminary study of*

neosorosis in dairy cattle of Sardinia. International Congress of the Fe.Me.SPRum, 7:387- 392

53. *McAllister M.M. et al., (1996). Evidence suggesting a point source exposure in a outbreak of bovine abortion due to neosporosis. J. Vet. Diagn. Invest. 8:355-357*
54. *McAllister M.M. et al., (1998). Dogs are definitive hosts for Neospora caninum. Int. J. Parasitol. 28:1473-1478*
55. *McAllister M.M. et al., (2000). Evidence of a point source exposure to Neoaspora caninum and protective immunity in a herd of beef cows. JAVMA 217:881.887*
56. *McAllister Diagnosis and Control of Bovine Neosporosis. (2016) Vet Clin North Am Food Anim Pract.;32(2):443-63. doi: 10.1016/j.cvfa.2016.01.012. Review*
57. *McCann CM, McAllister MM, Gondim LF, Smith RF, Cripps PJ, Kipar A, Williams DJ, Trees AJ. (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):1631-9. Epub 2007 Jun 12*
58. *McGarry JW, Stockton CM, Williams DJ, Trees AJ. (2003) Protracted shedding of oocysts of Neospora caninum by a naturally infected foxhound. J Parasitol.; 89(3):628-30*
59. *McGuire A.M. et al., (1999). Experimental inoculation of domestic pigeons (Columbia livia) and zebra finches (Poephila guttata) with Neospora caninum tachyzoites. Int. J. Parasitol. 29:1525-1529*
60. *McInnes LM, Ryan UM, O'Handley R, Sager H, Forshaw D, Palmer DG. (2006) Diagnostic significance of Neospora caninum DNA detected by PCR in cattle serum. Vet Parasitol. 2006;142(3-4):207-13*
61. *Moré G, Bacigalupe D, Basso W, Rambeaud M, Beltrame F, Ramirez B, Venturini MC, Venturini L. (2009) Frequency of horizontal and vertical transmission for Sarcocystis cruzi and Neospora caninum in dairy cattle. Vet Parasitol. 9;160(1-2):51-4. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.10.081*
62. *Moskwa B1, Pastusiak K, Bien J, Cabaj W. (2007) The first detection of Neospora caninum DNA in the colostrum of infected cows. Parasitol Res. ;100(3):633-6. Epub 2006 Oct 6*
63. *Nardelli S., Ceglie L., Merenda M., Dellamaria D., Natale A., Frangipane di Regalbono A., Capelli G. (2005) Monitoring dairy cattle neosporosis in Veneto region, northeastern Italy. The 20th International conference WAAP – Christchurch, New Zealand, 16-20 October 2005*
64. *Nogareda C, López-Gatius F, Santolaria P, García-Ispierto I, Bech-Sàbat G, Pabón M, Mezo M, Gonzalez-Warleta M, Castro-Hermida JA, Yániz J, Almeria S. (2007) Dynamics of anti-Neospora caninum antibodies during gestation in chronically infected dairy cows. Vet Parasitol. 30;148(3-4):193-9*
65. *Oshiro LM, Motta-Castro AR, Freitas SZ, Cunha RC, Dittrich RL, Meirelles AC, Andreotti*

R. (2015) Neospora caninum and Toxoplasma gondii serodiagnosis in human immunodeficiency virus carriers. Rev Soc Bras Med Trop., 48(5):568-72. doi: 10.1590/0037-8682-0151-2015

66. *Osoro K, Ortega-Mora LM, Martínez A, Serrano-Martínez E, Ferre I (2009) Natural breeding with bulls experimentally infected with Neospora caninum failed to induce seroconversion in dams. Theriogenology, 1;71(4):639-42. doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.09.035. Epub 2008 Oct 28*
67. *Otranto D. et al., (2003). Seroprevalence and associated risk factors of neosporosis in beef and dairy cattle in Italy. Vet. Parasitol. 118:7-18*
68. *Ohtsuka H, Uematsu M, Saruyama Y, Ono M, Kohiruimaki M, Ando T, Kawamura S. (2009) Age-related alterations in peripheral leukocyte population of healthy Holstein dairy cows during the pre-calving period. J Vet Med Sci.;71(8):1121-4*
69. *Paré J, Thurmond MC, Hietala SK. (1996) Congenital Neospora caninum infection in dairy cattle and associated calfhood mortality. Can J Vet Res. 60(2):133-9*
70. *Pereira LM, Yatsuda AP. (2014) Comparison of an ELISA assay for the detection of adhesive/invasive Neospora caninum tachyzoites. Rev Bras Parasitol Vet. 2014 Mar;23(1):36-43*
71. *Pereira Bueno J. et al., (2003). Evaluation by different diagnostic techniques of bovine abortion associated with Neospora caninum in Spain. Vet. Parasitol. 111:143-152*
72. *Petersen E. et al., (1999). Neospora caninum infection and repeated abortions in humans. Emerging Infectious Disease 5(2):278-280*
73. *Regidor-Cerrillo J, Arranz-Solís D, Benavides J, Gómez-Bautista M, Castro-Hermida JA, Mezo M, Pérez V, Ortega-Mora LM, González-Warleta M. (2014) Neospora caninum infection during early pregnancy in cattle: how the isolate influences infection dynamics, clinical outcome and peripheral and local immune responses. Vet Res 30;45:10. doi: 10.1186/1297-9716-45-10*
74. *Reichel MP, Alejandra Ayanegui-Alcérreca M, Gondim LF, Ellis JT. (2013)What is the global economic impact of Neospora caninum in cattle - the billion dollar question. Int J Parasitol.; 43(2):133-42. doi: 10.1016/j.ijpara.2012.10.022. Review*
75. *Reichel MP, McAllister MM, Pomroy WE, Campero C, Ortega-Mora LM, Ellis JT. (2014) Control options for Neospora caninum--is there anything new or are we going backwards? Parasitology;141(11):1455-70. doi: 10.1017/S0031182014000158. Review*
76. *Reichel MP, Moore DP, Hemphill A, Ortega-Mora LM, Dubey JP, Ellis JT. (2015) A live vaccine against Neospora caninum abortions in cattle.Vaccine. 10;33(11):1299-301. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.01.064*
77. *Reichel MP, McAllister MM, Nasir A, Moore DP. (2015) A review of Neospora caninum in water buffalo (Bubalus bubalis). Vet Parasitol.; 15;212(3-4):75-9. doi: 10.1016/j.vetpar.2015.08.008. Review*

78. *Rodrigues AA, Gennari SM, Aguiar DM, Sreekumar C, Hill DE, Miska KB, Vianna MC, Dubey JP. (2004) Shedding of Neospora caninum oocysts by dogs fed tissues from naturally infected water buffaloes (Bubalus bubalis) from Brazil. Vet Parasitol.;124(3-4):139-50*

79. *Rojo-Montejo S, Collantes-Fernández E, Blanco-Murcia J, Rodríguez-Bertos A, Risco-Castillo V, Ortega-Mora LM. (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):49. doi: 10.1051/vetres/2009032*

80. *Rojo-Montejo S, Collantes-Fernández E, Pérez-Zaballos F, Rodríguez-Marcos S, Blanco-Murcia J, Rodríguez-Bertos A, Prenafeta A, Ortega-Mora LM. (2013) Effect of vaccination of cattle with the low virulence Nc-Spain 1H isolate of Neospora caninum against a heterologous challenge in early and mid-gestation. Vet Res.1;44:106. doi: 10.1186/1297-9716-44-106*

81. *Romero JJ1, 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. 15;53(4):263-73*

82. *Romero J.J. et al., (2004). Effect of a killed whole Neospora caninum tachyzoite vaccine on the crude abortion rate of Costa Rican dairy cows under field condictions. Vet. Parasitol. 123:149-159*

83. *Rosbottom A, Guy CS, Gibney EH, Smith RF, Valarcher JF, Taylor G, Williams DJ. (2007) Peripheral immune responses in pregnant cattle following Neospora caninum infection. Parasite Immunol.;29(4):219-28*

84. *Sager H. et al., (2001). A Swiss case-control study to assess Neospora caninum-associated bovine abortions by PCR, histopathology and serology. Vet. Parasitol. 102:1-15*

85. *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):601-10. doi: 10.1111/j.1600-0897.2010.00852.x. Review*

86. *Scarpelli L.C. et al., (2001). Venereal transmission viability of Toxoplasma gondii in bovine. Prooceeding XVIII International Conference of the World Association for the advancement of Veterinay Parasitology. Pag. 22*

87. *Schares G, Rauser M, Zimmer K, Peters M, Wurm R, Dubey JP, de Graaf DC, Edelhofer R, Mertens C, Hess G, Conraths FJ. (1999) Serological differences in Neospora caninum-associated epidemic and endemic abortions. J Parasitol.;85(4):688-94*

88. *Schares G, Peters M, Wurm R, Bärwald A, Conraths FJ. (1998)The efficiency of vertical transmission of Neospora caninum in dairy cattle analysed by serological techniques. Vet Parasitol. 1998;80(2):87-98*

89. *Schares G, Heydorn AO, Cüppers A, Mehlhorn H, Geue L, Peters M, Conraths FJ. (2002) In contrast to dogs, red foxes (Vulpes vulpes) did not shed neospora caninum upon feeding of intermediate host tissues. Parasitol Res.;88(1):44-52. Erratum in: Parasitol*

Res 2002 Jun;88(6):592

90. *Schares G, Pantchev N, Barutzki D, Heydorn AO, Bauer C, Conraths FJ. (2005) Oocysts of Neospora caninum, Hammondia heydorni, Toxoplasma gondii and Hammondia hammondi in faeces collected from dogs in Germany. Int J Parasitol.;35(14):1525-37*
91. *Schumacher A, Costa SD, Zenclussen AC. (2014) Endocrine factors modulating immune responses in pregnancy. Front Immunol.; 8;5:196. doi: 10.3389/fimmu.2014.00196. Review*
92. *Thurmond M.C. & Vietala S.K., (1996). Culling associated with Neospora caninum infection in dairy cows. Am. J. Vet. Res. 210:672-674*
93. *Thurmond M.C. & Vietala S.K., (1997). Effect of Neospora caninum infection on milk production in first lactation dairy cows. JAVMA 57:1559-1562*
94. *Tranas J. et al., (1999). Serologica evidence of human infection with the protozoan Neospora caninum Clin. Diagn. Lab. Immunol. 6:765-767*
95. *Trees AJ, McAllister MM, Guy CS, McGarry JW, Smith RF, Williams DJ. (2002) Neospora caninum: oocyst challenge of pregnant cows.Vet Parasitol. 16;109(1-2):147-54*
96. *Trees AJ, Williams DJ. (2005) Endogenous and exogenous transplacental infection in Neospora caninum and Toxoplasma gondii. Trends Parasitol. 2005 Dec;21(12):558-61. Epub 2005 Oct 11*
97. *Varcasia A, Capelli G, Ruiu A, Ladu M, Scala A, Bjorkman C (2006). Prevalence of Neospora caninum infection in Sardinian dairy farms (Italy) detected by iscom ELISA on tank bulk milk. Parasitol Res, 98(3):264-267*
98. *Wapenaar W, Jenkins MC, O'Handley RM, Barkema HW. (2006) Neospora caninum-like oocysts observed in feces of free-ranging red foxes (Vulpes vulpes) and coyotes (Canis latrans). J Parasitol.;92(6):1270-4*
99. *Weber FH, Jackson JA, Sobecki B, Choromanski L, Olsen M, Meinert T, Frank R, Reichel MP, Ellis JT. (2013) On the efficacy and safety of vaccination with live tachyzoites of Neospora caninum for prevention of neospora-associated fetal loss in cattle. Clin Vaccine Immunol.;20(1):99-105. doi: 10.1128/CVI.00225-12. Epub 2012 Nov 21*
100. *Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. (1993) Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? Immunol Today.;14(7):353-6. Review*
101. *Williams DJ, Guy CS, McGarry JW, Guy F, Tasker L, Smith RF, MacEachern K, Cripps PJ, Kelly DF, Trees AJ. (2000) Neospora caninum-associated abortion in cattle: the time of experimentally-induced parasitaemia during gestation determines foetal survival. Parasitology.;121 (Pt 4):347-58*
102. *Williams D.J. et al., (2003). First demonstration of protective immunity against foetopathy in cattle with latent Neospora caninum infection. Int. J. Parasitol. 33:1059–1065*
103. *Williams DJ, Guy CS, Smith RF, Ellis J, Björkman C, Reichel MP, Trees AJ. (2007) Immuni-*

zation of cattle with live tachyzoites of Neospora caninum confers protection against fetal death. Infect Immun.;75(3):1343-8

104. *Wouda W, Moen AR, Schukken YH. (1998) Abortion risk in progeny of cows after a Neospora caninum epidemic.Theriogenology;49(7):1311-6*

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie
Viale dell'Università, 10 - 35020 Legnaro (Pd)
Tel. +39 049 8084211 Fax +39 049 8830046

comunicazione@izsvenezie.it
www.izsvenezie.it