

CONTROLLO DELLA NEOSPOROSI NELL'ALLEVAMENTO BOVINO

LINEE GUIDA



Progetto DEMONE - Miglioramento dell'efficienza riproduttiva e produttiva delle aziende di bovini da latte lombarde attraverso azioni di divulgazione e dimostrative di modelli gestionali per il controllo della neosporosi



Regione
Lombardia

Programma di Sviluppo Rurale 2014-2020

**Fondo Europeo Agricolo per lo Sviluppo Rurale:
l'Europa investe nelle zone rurali**

Publicazione realizzata con il cofinanziamento del FEASR
Responsabile dell'informazione: Nominativo del beneficiario
dell'Operazione

Autorità Di Gestione Del Programma: Regione Lombardia

Iniziativa realizzata nell'ambito del progetto DEMONE, cofinanziato dall'operazione 1.2.01 "Progetti dimostrativi e azioni di informazione" del Programma di Sviluppo Rurale 2014 – 2020 della Regione Lombardia.

Responsabile del progetto: Prof.ssa Maria Teresa Manfredi- Dipartimento di Medicina Veterinaria e Scienze Animali, Università degli Studi di Milano.

Partner: Associazione Regionale Allevatori della Lombardia (ARAL).

A cura di:

Maria Teresa Manfredi, Carolina Allievi, Luca Villa (Dipartimento di Medicina Veterinaria Scienze Animali, DIVAS), (Laboratorio di Ricerca di Malattie Parassitarie degli Animali e Zoonosi, ParVetLab).

Gruppo del Progetto di ricerca "**DEMONE**":

DIVAS ParVetLab

Maria Teresa Manfredi
Carolina Allievi
Alessia Libera Gazzonis
Michele Mortarino
Luca Villa
Sergio Aurelio Zanzani

ARAL

Flavio Sommariva
Walter Avogadri
Carmela Fusaro
Paolo Marconi

Finito di stampare nel 2022

PRESENTAZIONE

Nel presente volume sono state raccolte e riportate sinteticamente le attuali conoscenze riguardo alla neosporosi, dalle modalità di trasmissione, all’impatto sull’animale e sull’allevamento, fino alle principali metodiche diagnostiche utilizzate. In particolare, si è cercato, mediante un linguaggio semplificato, di evidenziare i punti cruciali di questa malattia che la rendono persistente negli allevamenti bovini da latte con i conseguenti effetti negativi sulla riproduzione e produttività della mandria. Le informazioni presentate sono basilari per la comprensione delle principali raccomandazioni e dei consigli operativi che vengono proposti agli allevatori, affinché siano applicati nelle aziende di bovini da latte in cui sono stati riscontrati problemi di neosporosi.

L’obiettivo primario è stato quello di fornire agli allevatori gli strumenti e alcune chiavi pratiche per contrastare l’entrata e la diffusione della neosporosi nei loro allevamenti; pertanto, questo documento si configura come una vera e propria guida che accompagna gli allevatori, e anche i tecnici, ad effettuare le scelte più opportune nei confronti di questa malattia che, oramai, possiamo definire endemica.

Le “Linee guida” sono state realizzate nell’ambito del progetto Demone, finanziato dalla Regione Lombardia, come azioni informative a disposizione degli allevatori. Sono anche disponibili online per il download, sul sito web del progetto Demone: <https://sites.unimi.it/demone>.

Maria Teresa Manfredi

Dipartimento di Medicina veterinaria e Scienze Animali



Progetto DEMONE

“Miglioramento dell’efficienza riproduttiva e produttiva delle aziende di bovini da latte lombarde attraverso azioni di divulgazione e dimostrative di modelli gestionali per il controllo della neosporosi.”

<https://sites.unimi.it/demone>

<https://www.aral.lom.it/progetti/progetto-demone/>

Contenuti:

| | |
|---|-----------|
| 1-Infezione da <i>Neospora caninum</i> e neosporosi bovina..... | 6 |
| Cos'è <i>Neospora caninum</i> | 6 |
| Come <i>Neospora caninum</i> causa malattia | 6 |
| Bovini | 6 |
| Cani | 7 |
| Come <i>Neospora caninum</i> si trasmette in allevamento? | 7 |
| Ciclo e vie di trasmissione..... | 7 |
| Ospiti definitivi..... | 7 |
| Ospiti intermedi..... | 8 |
| Come <i>Neospora caninum</i> arriva nella mandria? | 9 |
| Il cane aziendale è un rischio per l'infezione dei bovini? | 10 |
| La volpe e altre specie animali hanno un ruolo nella trasmissione dell'infezione nei bovini? | 10 |
| Quanto tempo può durare l'infezione nella mandria?..... | 10 |
| Trasmissione dell'infezione da <i>Neospora caninum</i> dalla bovina al feto | 11 |
| Devo isolare le bovine infette? | 13 |
| Le rimonte acquistate da altre aziende costituiscono un rischio per le altre bovine?..... | 13 |
| In aziende che non usano rimonta esterna, <i>Neospora caninum</i> può entrare ugualmente? | 13 |
| <i>Neospora caninum</i> provoca sempre aborto in tutte le bovine che contraggono l'infezione? | 14 |
| L'infezione da <i>Neospora caninum</i> è frequente negli allevamenti bovini della Lombardia? | 16 |
| L'infezione da <i>Neospora caninum</i> in Lombardia: risultati del Progetto "DEMONE" | 17 |
| Analisi spaziale di <i>Neospora caninum</i> negli allevamenti bovini lombardi..... | 19 |
| L'impatto dell'infezione da <i>Neospora caninum</i> | 20 |
| Le informazioni raccolte nelle stalle del progetto "DEMONE" | 20 |
| Casi di studio aziendale e fattori critici per <i>Neospora caninum</i> | 23 |
| 2-La diagnosi dell'infezione da <i>Neospora caninum</i> | 25 |
| In che modo posso sapere se l'infezione da <i>Neospora caninum</i> è presente nella mandria? | 25 |
| Quali campioni servono per avere la diagnosi su casi di aborti?..... | 25 |
| Diagnosi sierologica | 27 |
| Quali test uso per diagnosticare l'infezione in una bovina? | 28 |
| Analisi sul sangue..... | 28 |
| Analisi sul latte..... | 28 |
| Che cosa indica il risultato del test? | 28 |
| Esame patologico eseguito su feto o placenta | 28 |
| Esami sierologici sul feto o sulla madre..... | 29 |
| Qual è il periodo migliore per eseguire il test sulle bovine? | 30 |
| È necessario testare i vitelli? | 30 |
| Strategie diagnostiche da utilizzare in funzione dell'obiettivo che si vuole raggiungere | 31 |

| | |
|--|-----------|
| 3-Controllo dell'infezione da <i>Neospora caninum</i> e della neosporosi | 33 |
| Esiste un vaccino per <i>Neospora caninum</i> ? | 33 |
| Posso trattare gli animali infetti? | 33 |
| Dopo una "tempesta di aborti" cosa succede nella mandria negli anni successivi? | 33 |
| È possibile liberarsi dell'infezione da <i>Neospora caninum</i> una volta che è entrata nella mandria? | 34 |
| Devo eliminare le bovine positive? | 35 |
| Quali sono le misure di biosicurezza che posso adottare per controllare l'infezione da <i>Neospora caninum</i> ? | 35 |
| Pratiche di gestione aziendale per il controllo dell'infezione da <i>Neospora caninum</i> | 37 |
| Come posso ridurre gli effetti economici legati all'infezione da <i>Neospora caninum</i> ? | 39 |
| Valutazione del rischio e strategie di controllo | 40 |
| Programmi di controllo della neosporosi | 41 |
| Interventi attuabili in relazione all'esito dell'esame sierologico | 42 |
| Conclusioni | 43 |
| Ringraziamenti | 43 |
| Voci bibliografiche | 44 |

1. Infezione da *Neospora caninum* e neosporosi bovina

Cos'è *Neospora caninum*?

Neospora caninum è un parassita di natura protozoaria, a lungo confuso con *Toxoplasma gondii*, della medesima Famiglia Sarcocystidae (Apicomplexa), con il quale condivide alcune caratteristiche morfologiche e biologiche. In ambito zootecnico, la sua importanza è dovuta all'impatto che caratterizza l'infezione nel bovino, in quanto rappresenta una delle principali cause di aborto negli allevamenti, dove la trasmissione verticale da madre a feto ne consente il mantenimento.

La sua trasmissione è avvantaggiata dalla presenza di tre stadi infettanti dotati anche di notevole resistenza:

- I bradizoiti, forma a replicazione lenta. Sono racchiusi all'interno delle cisti tissutali, ovvero forme di resistenza che si sviluppano nei tessuti dell'ospite intermedio; le cisti riparano i bradizoiti dalla risposta immunitaria dell'ospite, facilitando la persistenza a lungo termine del parassita e determinando le infezioni croniche asintomatiche.
- I tachizoiti, forma a rapida replicazione, intracellulare. Essi si diffondono in tutto l'organismo, feto compreso, durante la fase acuta.
- Le oocisti sono invece la forma di contaminazione ambientale e di particolare resistenza. Diventano infettanti attraverso un processo di sporulazione dopo 24-72 ore dall'emissione nelle feci che porta alla formazione di 2 sporocisti contenenti ciascuna 4 sporozoiti.

Come *Neospora caninum* causa malattia

Bovini

Neospora caninum è una delle principali e più importanti cause di aborto infettivo nel bovino e l'aborto rappresenta l'unico segno clinico di neosporosi nel bovino adulto. Le bovine possono abortire in qualsiasi momento della gestazione, ma la maggior parte degli aborti avviene nell'intervallo temporale compreso fra il quarto e il sesto mese di gravidanza. L'aborto è conseguente al passaggio del parassita (sotto forma di tachizoite) dalla madre al feto. Tuttavia, a seconda dell'epoca gestazionale in cui avviene il passaggio transplacentare dei tachizoiti, l'esito può essere diverso. Infatti, se l'infezione

parassitaria avviene nel primo trimestre di gravidanza si assiste al riassorbimento embrionale con conseguente ritorno in calore della bovina. Nel secondo trimestre si ha la mummificazione fetale con successivo aborto oppure la nascita di animali disvitali e sintomatici. Infine, nell'ultimo trimestre di gestazione si osserva la nascita di vitelli vivi, sani ed asintomatici, ma infetti. Quest'ultima evenienza rappresenta la principale causa del mantenimento dell'infezione in azienda, in quanto le vitelle nate, che dovrebbero costituire la rimonta interna dell'allevamento, non presentano alcun segno clinico se non quando, una volta fecondate, abortiscono e hanno successivi ritorni di calore. Nei vitelli che nascono infetti e sintomatici i segni clinici rilevabili sono atassia, esoftalmo, debolezza e iperestensione degli arti; in generale, questi animali non sopravvivono.

Cani

Negli ospiti definitivi, ovvero i cani, normalmente non si osservano segni clinici. Nel caso di cuccioli (< 6 mesi di età) infettati per via transplacentare si può assistere ad una grave forma con quadro clinico neuromuscolare a decorso fatale con lo sviluppo di una paralisi ascendente progressiva a partire dagli arti posteriori che presentano rigidità tipica e iperestensione.

Come *Neospora caninum* si trasmette in allevamento?

Ciclo e vie di trasmissione

Il ciclo biologico vede la partecipazione di due categorie di ospiti:

1. gli ospiti definitivi, in cui il parassita svolge la fase intestinale del ciclo, sono il cane e altri canidi selvatici, ovvero il lupo, il dingo e il coyote;
2. gli ospiti intermedi, in cui il parassita svolge solo la fase extra-intestinale del ciclo, sono numerosi mammiferi domestici e selvatici, tra cui il bovino, la pecora, la capra, il cervo, il cavallo, il bufalo, il suino e il cinghiale, alcune specie di roditori, lagomorfi e uccelli, e il cane stesso.

Ospiti definitivi

Il cane si infetta mediante l'ingestione di tessuti e/o organi contenenti cisti tissutali di *Neospora*, come feti abortiti e invogli fetali degli ospiti intermedi, principalmente i bovini. Nel cane, l'infezione per via orale mediante l'ingestione di cisti tissutali e la successiva liberazione di bradizoiti nell'intestino, porta alla replicazione del parassita nella mucosa intestinale fino alla produzione di oocisti non sporulate escrete con le feci nell'ambiente esterno, dove la sporulazione avviene in 24-72 ore. A questo punto, le

oocisti diventano infettanti per gli ospiti intermedi. Nel cane è riconosciuta anche una via di trasmissione transplacentare, soprattutto nel caso di cagne infette cronicamente. I cani sono ospiti completi del ciclo parassitario: infatti, oltre a essere ospiti definitivi nel ciclo di *N. caninum* emettendo oocisti da 8 a 23 giorni dopo l'infezione, possono essere ospiti intermedi, albergando cisti tissutali a livello cerebrale.

Ospiti intermedi

Negli ospiti intermedi, principalmente i bovini, si svolge solo la fase extra-intestinale del ciclo del parassita; questi si infettano mediante due principali vie di trasmissione:

- **La via orizzontale**, attraverso l'ingestione di alimenti o acqua contaminati da oocisti infettanti, che sono andate incontro a sporulazione dopo l'emissione da parte dell'ospite definitivo, il cane.
- **La via verticale**, che è la più frequente, è quella responsabile del mantenimento dell'infezione all'interno degli allevamenti, mediante il passaggio transplacentare dei tachizoiti al feto. Nella via verticale si distingue una **trasmissione esogena** e una **endogena**.

La **trasmissione esogena** avviene quando l'animale gravido contrae l'infezione durante il periodo di gestazione, mediante l'ingestione di oocisti sporulate presenti in ambiente; mentre **quella endogena**, si ha quando si assiste ad una riattivazione di un'infezione cronica (a sua volta contratta per via orizzontale o congenita) a seguito della replicazione rapida di tachizoiti presenti nelle cisti del tessuto nervoso.

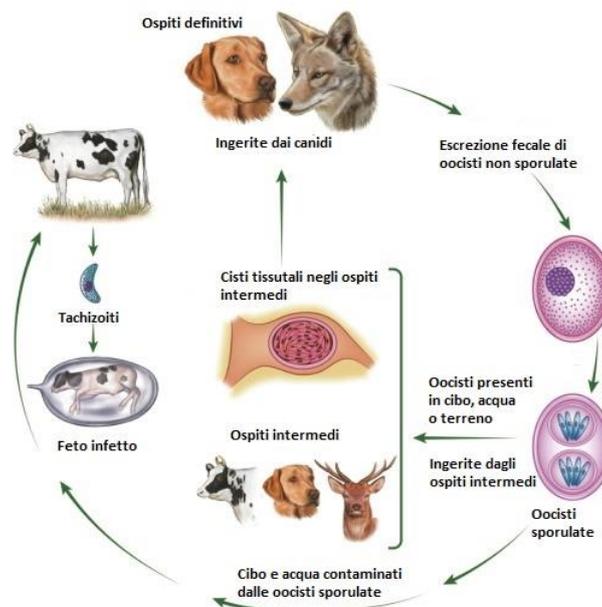


Fig. 1. Ciclo biologico di *Neospora caninum* (modificato da Dubey et al., 2017)

Come *Neospora caninum* arriva nella mandria?

Esistono diverse modalità che consentono a *Neospora* di penetrare in un allevamento di bovini: uso di rimonte infette, presenza di cani, fauna selvatica o tramite acqua potabile e mangimi contaminati.

- 1.** Introdurre inavvertitamente bovini persistentemente infetti che appaiono clinicamente sani è la modalità più comune per introdurre *Neospora* in un allevamento. Questi animali potrebbero non aver avuto alcun aborto e quindi non destare sospetti. Se dovessero abortire o se partoriscono, allora la placenta e i feti morti possono essere infetti dal parassita e, nell'eventualità che tali tessuti vengano ingeriti dal cane, esso può infettarsi e produrre oocisti, stadi del parassita infettanti per il bovino. Peraltro, questi bovini, essendo infetti, hanno una probabilità molto elevata di trasmettere *Neospora* verticalmente anche per diverse generazioni.
- 2.** Se cani infetti entrano in allevamento, disseminano le oocisti del parassita mediante le loro feci nell'ambiente. Questa evenienza rappresenta un grave rischio per i bovini non infetti in quanto le oocisti possono sopravvivere per più di 6 mesi e contaminano il mangime o l'acqua del bestiame.
- 3.** La fauna selvatica è potenzialmente un'altra fonte di infezione, in particolare perché molte specie, come roditori, conigli o uccelli, fungono da ospite intermedio. Se la fauna selvatica infetta venisse ingerita da un cane, ciò potrebbe causare l'infezione del cane e di conseguenza la disseminazione delle oocisti. Tra i carnivori selvatici presenti in Italia, solo il lupo può essere ospite definitivo di *Neospora*, mentre i dati finora disponibili indicano che le volpi non costituiscono un rischio reale per i bovini.
- 4.** L'acqua da bere per il bestiame può essere contaminata dalle oocisti di *Neospora*; a seconda della fonte idrica considerata. L'acqua di corsi fluviali o canali può essere contaminata a causa di feci di cane deposte nelle aree a monte, se sono frequentate da questi carnivori.
- 5.** Anche il mangime per bovini può essere una fonte di infezione se è contaminato da feci di cane contenenti oocisti.

Pertanto, i cani devono essere tenuti lontani dalle aree in cui viene immagazzinato il mangime per il bestiame.

Il cane aziendale è un rischio per l'infezione dei bovini?

I cani possono infettarsi mangiando la placenta eliminata da bovine che hanno appena partorito e carcasse di bovini o carne cruda, mentre i feti abortiti sembrano essere una fonte di infezione meno probabile. È necessario impedire l'accesso dei cani alle zone parto e la conseguente ingestione delle placente di bovine infette. Bisogna limitare il numero di cani presenti in allevamento, evitare la nascita di cucciolate, in quanto i cuccioli sono più frequentemente escretori di oocisti, e, soprattutto, bloccare l'accesso in azienda a cani vaganti e ad altri animali selvatici che entrano a far parte del ciclo parassitario come ospiti definitivi. Inoltre, ratti, topi, micromammiferi silvestri (topo selvatico) e lagomorfi (lepre e minilepre) possono essere infetti e alimentare il ciclo di *Neospora caninum*.

La volpe e altre specie animali hanno un ruolo nella trasmissione dell'infezione nei bovini?

La possibilità che le volpi possano costituire un ospite definitivo in grado di produrre oocisti in seguito all'esposizione al parassita è molto discussa. Nelle volpi, oocisti di *Neospora* sono state riscontrate in natura da diversi ricercatori, ma l'unico tentativo di infezione sperimentale di volpi con *Neospora* non ha portato alla produzione di oocisti. Di conseguenza, mancano ancora le prove definitive a supporto del fatto che le volpi possano liberare oocisti. È molto probabile che l'eliminazione di oocisti avvenga da parte di animali molto giovani, ad esempio i cuccioli di volpe. Studi di sieroprevalenza sulle volpi europee hanno dimostrato valori di positività molto bassi, inferiori all'1%. Un recente lavoro condotto su volpi del Centro Italia, non ha messo in evidenza il DNA del parassita nel cervello di 71 volpi analizzate.

Diversi studi hanno invece dimostrato che numerose specie selvatiche, roditori, lepri, tassi, uccelli selvatici, possano rivestire il ruolo di ospiti intermedi.

Quanto tempo può durare l'infezione nella mandria?

Se *Neospora caninum* penetra in un allevamento è molto difficile allontanarlo in quanto non esiste alcun trattamento o vaccino che possa eliminare il protozoo negli animali infetti. Una ulteriore complicazione è legata alle modalità di trasmissione particolarmente efficaci, dalle madri infette ai loro feti, che porterà ad aborti o, nel caso peggiore, alla nascita di vitelli infetti che possono apparire clinicamente sani. Infatti, i vitelli apparentemente sani, a loro volta, possono trasmettere l'infezione alla prole nelle successive gravidanze.

Ne consegue che il parassita può persistere all'interno di una mandria per molte generazioni anche senza l'intervento dei cani.

L'infezione da *Neospora* si manifesterà nella mandria con sporadici casi di aborto. Il materiale dell'aborto insieme alle placente infette può essere una fonte di infezione per i cani aziendali che non hanno avuto contatti precedenti con il parassita, portando alla produzione di oocisti, alla contaminazione dell'ambiente e quindi all'infezione dei bovini.

Trasmissione dell'infezione da *N. caninum* dalla bovina al feto

- ❖ La trasmissione di *Neospora* da una bovina infetta al feto è considerata la via di trasmissione più importante che mantiene il parassita all'interno della popolazione bovina. Si stima che circa il 90% delle bovine infette trasmetta il parassita alla prole durante la gravidanza. Ciò significa che una volta che il parassita è all'interno di una mandria, può essere mantenuto per molte generazioni, senza che sia necessariamente presente l'ospite definitivo, il cane.
- ❖ Ad ogni parto, la bovina infetta produce una placenta che può contenere parassiti subito infettanti per i cani creando così l'opportunità per il cane di produrre oocisti che potrebbero infettare altri bovini. Nel cane, il parassita ha la probabilità di essere trasmesso per via transplacentare anche nelle gravidanze successive in assenza di reinfezioni.
- ❖ Le vitelle infette trasmettono il parassita alla loro prole e producono a loro volta, al momento del parto, tessuti infetti che potrebbero fungere da fonte di infezione per cani e altri carnivori.
- ❖ Generalmente una bovina ingerisce la propria placenta dopo il parto e occasionalmente anche materiale placentare lasciato da altre bovine della mandria. È stato ipotizzato che ciò possa costituire una ulteriore via di trasmissione per *Neospora*. Tuttavia, non ci sono prove valide che questa sia un'importante via naturale di trasmissione.
- ❖ La tempistica dell'infezione da *Neospora* o la riattivazione di un'infezione persistente del parassita durante la gravidanza è molto importante nel determinare l'esito dell'infezione:

- ❖ Se l'infezione si verifica durante il primo trimestre di gravidanza allora (la probabilità di trasmissione è relativamente più bassa rispetto alla fase successiva della gravidanza) c'è un alto rischio che il feto muoia in quanto non ha la capacità di produrre una risposta immunitaria protettiva in grado di controllare il parassita. Con il progredire della gravidanza, il feto matura e così anche il suo sistema immunitario.
- ❖ La risposta immunitaria della madre cambia naturalmente durante la gravidanza per favorire lo sviluppo sicuro del feto e proteggerlo dal rigetto immunologico (il feto può somigliare a un innesto di tessuto estraneo all'interno della madre). Le risposte immunitarie che si sviluppano in gravidanza sono meno efficienti nel controllo della moltiplicazione di *Neospora*.
- ❖ Se la bovina si infetta dopo il terzo trimestre, è poco capace di prevenire la trasmissione di *Neospora* al feto a seguito della colonizzazione della placenta da parte del protozoo. Tuttavia, nelle fasi successive della gestazione, il feto è maggiormente in grado di controllare l'infezione in caso di trasmissione. Ciò significa che le infezioni da *Neospora* contratte in gravidanza avanzata di solito provocano la nascita di vitelli con infezione persistente piuttosto che l'aborto.
- ❖ È molto probabile che le vitelle, infettate durante la gravidanza, trasmettano il parassita alla prole successiva e una parte di questi animali abortirà alla prima gravidanza.



Devo isolare le bovine infette?

Non è necessario isolare le bovine infette in quanto non ci sono prove di una trasmissione diretta di *Neospora* tra bovini adulti. L'unico modo in cui i bovini adulti possono essere infettati da *Neospora* è attraverso l'ingestione di oocisti. Pertanto, se l'ospite definitivo, il cane, può essere escluso dal ciclo di trasmissione, allora tutti i bovini adulti non infetti saranno al sicuro. Ciò consentirà agli allevatori di eliminare *Neospora* dalla mandria scegliendo le rimonte da bovine non infette da *Neospora* e nel tempo eliminare gli animali infetti.

Esiste un lavoro sperimentale in cui è stato dimostrato che è possibile infettare vitelli neonati molto giovani, di 6 ore, con campioni di colostro addizionati con tachizoiti vivi. Tuttavia, non si ritiene che questa sia una via naturale di trasmissione significativa. Allo stesso modo, non si ritiene che lo sperma che potrebbe contenere tachizoiti di *Neospora* sia importante nella trasmissione del parassita ai bovini.

Le rimonte acquistate da altre aziende costituiscono un rischio per le altre bovine?

Non esistono norme ufficiali per il controllo della neosporosi che possano essere di aiuto nelle compravendite di animali; perciò, l'acquisto di animali risulta essere un importante fattore di rischio.

Per controllare questo fattore di rischio è consigliabile attenersi ad una delle seguenti indicazioni:

- Privilegiare l'acquisto di rimonta dalle aziende che effettuano screening sierologici routinari.
- Acquistare animali da aziende sieronegative e che effettuano un piano di controllo per la neosporosi.
- Richiedere un test sierologico sugli animali che si vogliono acquistare.

In aziende che non usano rimonta esterna, *Neospora caninum* può entrare ugualmente?

L'ingresso di *Neospora* in una azienda che per la rimonta utilizza solo soggetti nati in allevamento può essere ricondotto a:

- Presenza di cani e altri animali in allevamento o nelle aree adiacenti l'azienda.
- Contaminazione dell'acqua di abbeverata o dell'alimento. Risulta di fondamentale importanza proteggere tutte le fonti alimentari e l'acqua di abbeverata da ogni

possibile contaminazione fecale da parte dei cani. In azienda è possibile stoccare il foraggio in un luogo chiuso, protetto, al riparo dagli animali e dall'ambiente esterno. Alimenti acquistati (es. fieni) potrebbero essere già contaminati nell'area di produzione.

- Contaminazione del pascolo. Il pascolo rappresenta un fattore di rischio in quanto può essere contaminato da feci di cani vaganti e lupi. Una strategia può essere quella di utilizzare terreni recintati tenuti sotto sorveglianza.

Neospora caninum provoca sempre aborto in tutte le bovine che contraggono l'infezione?

L'aborto causato da *Neospora* può presentarsi in allevamento con andamenti diversi; si distinguono:

- Una forma abortigena di tipo sporadico con un tasso annuale di aborti inferiore al 3%.
- Una forma endemica in cui si osserva un tasso di aborti, soprattutto dovuti all'infezione per via transplacentare endogena, costante nel tempo e che può arrivare fino al 10%.
- Una forma epidemica per trasmissione orizzontale che, in breve tempo, arriva a interessare fino al 30% delle bovine gravide con la comparsa simultanea o in rapida successione di aborti; la cosiddetta "tempesta di aborti".

Le bovine che hanno già abortito possono abortire nuovamente nelle gravidanze successive. È stato dimostrato che all'aumentare della sieropositività aumenta il rischio di aborto: le bovine sieropositive presentano un rischio di aborto da 2 a 12 volte superiore rispetto alle bovine sieronegative. Le bovine più giovani (manze) hanno più probabilità di abortire rispetto alle bovine adulte che hanno avuto più tempo di elaborare una risposta immunitaria. Peraltro, la trasmissione per via congenita è più elevata nelle bovine giovani ed arriva al 95%; diminuisce leggermente con l'aumentare dell'età delle bovine.

Non sempre l'infezione da *Neospora* durante la gravidanza determina l'aborto.

Quando *Neospora* infetta una bovina, il protozoo inizia a moltiplicarsi nell'ospite e il sistema immunitario si attiva cercando di limitare la diffusione dell'infezione e contenere il parassita. Si crea una relazione dinamica tra il parassita e il sistema immunitario della bovina che determinerà se l'infezione si tradurrà o meno in malattia.

In un animale non gravido il sistema immunitario è in grado di combattere l'infezione e limita l'attività dello stadio di tachizoite a rapida replicazione di *Neospora*. Di

conseguenza, il parassita si nasconde all'interno delle cellule e si sviluppa nello stadio di bradizoite (stadio a moltiplicazione lenta). Il bradizoite è tenuto sotto controllo dal sistema immunitario e il parassita nella bovina vive all'interno di cisti tissutali solitamente localizzate nel tessuto cerebrale.

In un animale gravido in cui il sistema immunitario subisce naturalmente dei cambiamenti, *Neospora* si avvantaggia di questi cambiamenti, sfugge dalle cisti in cui è contenuta e per via ematica si diffonde alla placenta dove si moltiplica ed infetta anche le cellule del feto.

Se *Neospora* invade la placenta nei primi 3-4 mesi di gravidanza la bovina produrrà una forte risposta infiammatoria per limitare la diffusione ed eliminare il protozoo.

Come risultato della risposta immuno-infiammatoria, la placenta subisce dei danni e le sue funzioni vengono alterate con conseguenze fatali sul feto

La maturità della risposta immunitaria fetale ha anche importanti conseguenze per l'esito della malattia:

- ❖ Nei primi cento giorni di gestazione il sistema immunitario fetale è molto immaturo e se il parassita infetta il feto in questa fase l'esito sarà inevitabilmente fatale.
- ❖ Con il progredire della gestazione, il sistema immunitario del feto inizia a maturare e il feto può creare le proprie risposte immunitarie e iniziare a difendersi dall'attacco di *Neospora*.
- ❖ Le infezioni che si verificano più tardi nella gestazione, nell'ultimo terzo della gravidanza, difficilmente provocano la morte del feto, anche se è molto probabile che il vitello nasca infetto da *Neospora*.



L'infezione da *Neospora caninum* è frequente negli allevamenti bovini della Lombardia?

Neospora caninum rappresenta uno fra i principali agenti infettivi abortigeni nei bovini, determinando ingenti perdite economiche, in particolare nelle industrie lattiero-casearie. L'industria lattiero-casearia è un settore economico rilevante in Italia con 25.525 aziende agricole che producono migliaia di tonnellate di latte all'anno con un fatturato di circa 16,3 miliardi di euro. La maggior parte delle aziende si concentra in Nord Italia, in particolar modo in Lombardia, che è caratterizzata da un'elevata densità di allevamenti di bovini.

L'infezione da *Neospora caninum* nei bovini è stata segnalata nella maggior parte del mondo con valori di prevalenza sierologica variabili: in Europa è stata evidenziata una prevalenza complessiva del 13%. In Italia, non essendo presenti piani di controllo ufficiali, i dati epidemiologici si deducono dalle analisi effettuate da laboratori, con ampie variabilità dovute ai metodi diagnostici utilizzati, al tipo di allevamento, alla valutazione condotta a livello individuale o aziendale.

Sul territorio italiano sono stati condotti pochi studi epidemiologici sui bovini, con valori di sieroprevalenza che variano dal 44.1% al 77.8% a livello di mandria, a seconda delle regioni geografiche e dei metodi di analisi. In Nord Italia si stima una sieroprevalenza media di 20% e circa il 50% degli allevamenti registra almeno un capo positivo all'indagine sierologica. Inoltre, un recente studio condotto in Lombardia su feti abortiti di bovine da latte di razza Frisona ha rilevato, mediante real-time PCR (*Polymerase Chain Reaction*), una positività molecolare pari al 27.8%. Al Sud la sieroprevalenza è leggermente inferiore, fatta eccezione per la Sardegna, dove nelle aziende di bovini da latte si registrano valori medi di 55%.

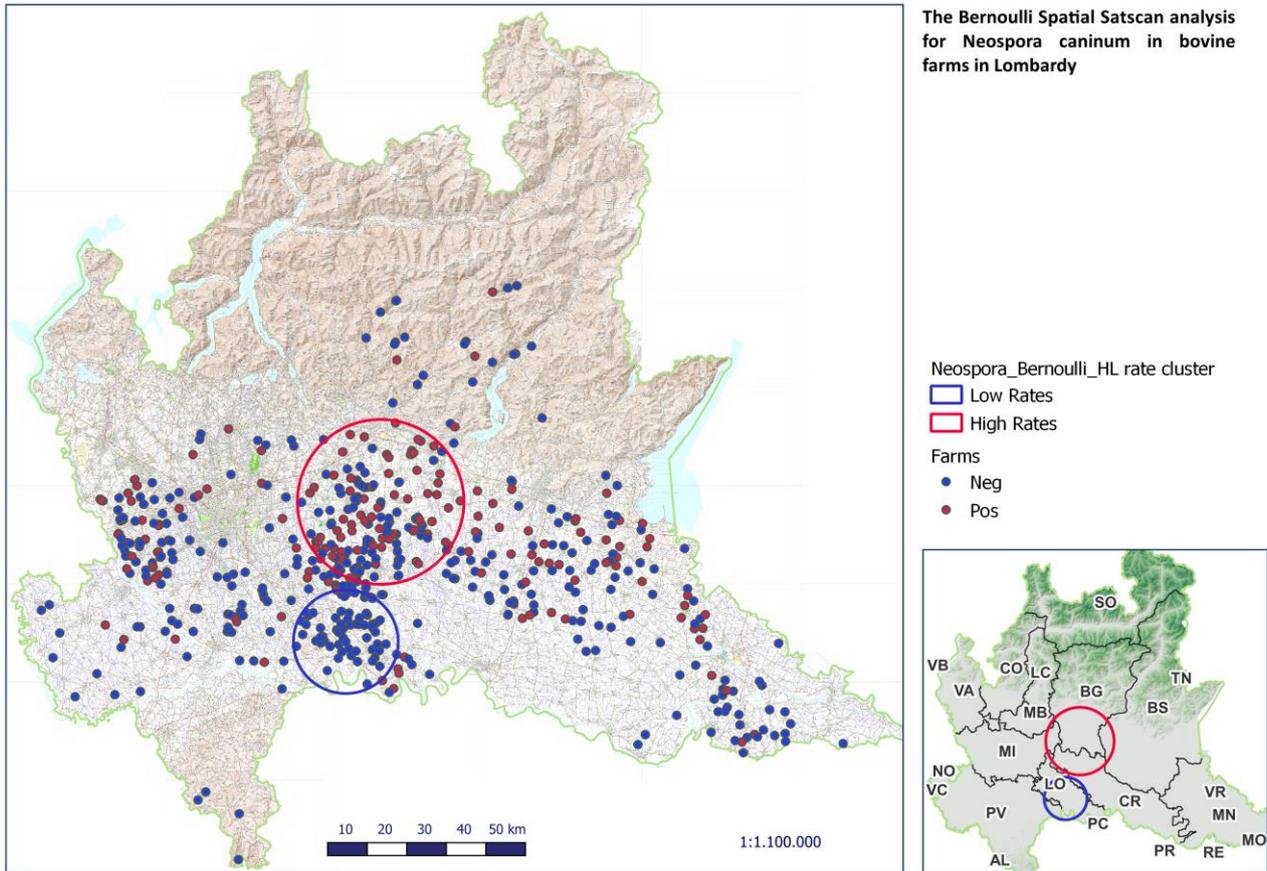
L'infezione da *Neospora caninum* in Lombardia: risultati del Progetto "DEMONE"

Uno degli obiettivi del progetto "DEMONE" è stato quello di fornire il quadro territoriale dell'impatto della neosporosi e, per raggiungere tale obiettivo, sono stati analizzati campioni di latte di massa. Sono stati raccolti 586 campioni provenienti da allevamenti bovini delle province di Bergamo, Brescia, Cremona, Lodi, Mantova, Milano e Pavia, grazie alla collaborazione dell'Associazione Regionale Allevatori della Lombardia (ARAL). I campioni sono stati analizzati attraverso un Kit ELISA commerciale (ID Screen® *Neospora caninum* Milk Indirect, Innovative Diagnostics, France) per la ricerca di anticorpi specifici anti-*N. caninum* in latte individuale o di massa. I dati delle caratteristiche aziendali ricavati dal software manageriale sono stati analizzati in relazione alla positività a *Neospora*. Gli allevamenti inclusi avevano una consistenza media di 351,6 animali con una età media di 3,2 anni e una produzione media giornaliera di latte di 24,8 kg. Di questi, 180 sono risultati positivi, ottenendo una prevalenza del 30,7%. In particolare, i valori di sieropositività sono risultati più alti nelle province di Bergamo (P=41,7%), Brescia (P=40,4%), Cremona (P=38,4%) e Milano (P=32,3%) rispetto a quelle di Lodi (P=13,5%), Mantova (P=24,2%) e Pavia (P=13,7%). Per quanto riguarda la consistenza delle aziende, si è riscontrata una maggiore prevalenza dell'infezione da *Neospora* in quelle aziende di classe medio-piccola con un numero di animali compreso tra 101 e 300 capi (P=40%). Considerando l'età, gli animali oltre i 4 anni sono risultati maggiormente esposti all'infezione (P=37,7%). Inoltre, è stato valutato l'impatto di *N. caninum* sulle performance aziendali. Per quanto concerne i parametri riproduttivi, il numero di inseminazioni per il concepimento era maggiore negli allevamenti positivi; infatti, il 39,7% presentavano animali "repeat breeders" con una media di almeno 3 interventi fecondativi. Inoltre, l'intervallo parto-concepimento risultava più lungo nelle mandrie positive, con il 37,9% delle aziende che presentavano bovine con un intervallo superiore a 150 giorni. Nessun effetto è invece stato dimostrato per i giorni di mungitura tra allevamenti negativi e positivi. Per quanto riguarda i parametri produttivi, le mandrie positive al protozoo avevano una produzione media giornaliera inferiore, in quanto la maggior parte (40,2%) riportava meno di 20 kg di latte. Inoltre, il conteggio delle cellule somatiche nel latte era superiore a 300.000 nel 40,3% delle aziende positive. Infine, non è stata rivelata alcuna differenza sull'Equivalente Vacca Matura e sul contenuto di grassi e proteine nel latte.

Prevalenza di *Neospora caninum* in campioni di latte di massa di allevamenti bovini lombardi in riferimento alle variabili analizzate

| Variabile | Classi | P% (n allevamenti positivi /esaminati) |
|--|-----------------|---|
| Provincia | Bergamo | 41,7% (40/96) |
| | Brescia | 40,4% (40/99) |
| | Cremona | 38,4% (33/86) |
| | Lodi | 13,5% (12/89) |
| | Mantova | 24,2% (16/66) |
| | Milano | 32,3% (32/99) |
| | Pavia | 13,7% (7/51) |
| Consistenza | ≤ 100 | 24% (18/75) |
| | 101 – 300 | 40% (98/245) |
| | 301 – 500 | 28,2% (41/145) |
| | > 500 | 19,2% (23/120) |
| Età | ≤2 | 12% (3/25) |
| | 3 | 29,9% (128/427) |
| | ≥4 | 37,7% (46/122) |
| Numero di inseminazioni | < 2 | 25% (22/88) |
| | 2-3 | 29,3% (107/365) |
| | > 3 | 39,7% (48/121) |
| Intervallo parto-concepimento | ≤ 150 | 21% (50/238) |
| | > 150 | 37,9% (126/332) |
| Produzione giornaliera di latte in Kg | < 20 | 40,2% (49/122) |
| | 21-25 | 37,6% (64/170) |
| | 26-30 | 21,9% (31/141) |
| | > 30 | 20,4% (20/98) |
| Conta delle cellule somatiche | < 200000 | 26% (44/169) |
| | 200000 – 300000 | 30,6% (86/281) |
| | > 300000 | 40,3% (50/124) |

Analisi spaziale di *Neospora caninum* negli allevamenti bovini lombardi.



La distribuzione geografica degli allevamenti positivi con il più alto livello di probabilità di infezione è localizzata nei settori centrale e occidentale della Pianura Padana. Inoltre, sono stati evidenziati due cluster di aziende significativi: in rosso, un cluster ad alto rischio con una prevalenza del 50% e un rischio relativo di 2,1 e, in blu, un cluster a basso rischio senza casi di infezione e un valore atteso del 20,6%.

L'impatto dell'infezione da *Neospora caninum*

La perdita economica dovuta alla neosporosi è causata soprattutto dai problemi riproduttivi a seguito dell'infezione. Infatti, l'aborto provoca sia costi diretti sia indiretti, come le spese legate al consulto professionale del veterinario, alla diagnosi sui feti e sulle madri, l'allungamento degli intervalli riproduttivi e la sostituzione delle vacche riformate. In particolar modo, il forte impatto economico è legato all'aumento del numero di inseminazioni necessarie per fecondare le vacche, e quindi alla presenza di "repeat breeders" in allevamento, all'allungamento dell'intervallo inter-parto e di quello parto-concepimento e alla perdita della produzione latte a seguito del fenomeno abortivo. Parimenti, alcuni studi hanno suggerito un effetto avverso del parassita all'inizio della gravidanza manifestato come un ritorno in calore, un aumento dell'intervallo parto-concepimento e di quello tra i parti nelle vacche sieropositive. Una riduzione dell'aumento di peso e dell'efficienza di ingestione alimentare è stata riportata nei vitelli e bovini da carne, anche se questi dati sono ancora controversi.

A livello mondiale si stimano perdite medie che vanno dai 600 milioni a 2 miliardi di dollari all'anno, di cui i due terzi negli allevamenti da latte e un terzo in quelli da carne. Il principale motivo per cui negli allevamenti da latte le perdite sono maggiori è che il costo di un aborto comprende, non solo la perdita del vitello, ma anche la perdita della produzione di una lattazione.

Un recente studio italiano condotto in due aziende di bovini da latte lombarde arruolate come caso-studio ha suggerito come l'infezione da *N. caninum* possa influenzare negativamente sia i parametri riproduttivi, ovvero il numero di inseminazioni e i giorni in mungitura, che quelli produttivi, espressi come produzione media giornaliera e Equivalente Vacca Maturo.

L'impatto dell'infezione da *Neospora caninum* negli allevamenti lombardi: le informazioni raccolte nelle stalle del Progetto "DEMONE"

A seguito dello screening epidemiologico su latte di massa sono state selezionate undici aziende risultate positive in cui è stato effettuato uno studio approfondito sulla sieroprevalenza intra-aziendale di *N. caninum* e valutare l'effetto del parassita sulle performance aziendali. Le aziende arruolate appartenevano alle province di Cremona (n=6), Bergamo (n=2), Milano (n=2) e Lodi (n=1), tutte erano caratterizzate da una conduzione convenzionale con management intensivo. Si tratta di allevamenti di bovine da latte basati sulla razza Frisona Italiana, di media consistenza con un numero medio di animali pari a 419 capi di età media di 43 mesi, con produzione media giornaliera di 35

kg di latte ed Equivalente Vacca Maturo di 11263. In queste aziende sono stati campionati tutti gli animali di età pari o superiore a 24 mesi per l'esame sierologico per la ricerca e la successiva titolazione di anticorpi specifici anti-*N. caninum* mediante tecnica di immunofluorescenza indiretta. Inoltre, sono stati raccolti dati individuali relativi ad età, numero di lattazione, parametri produttivi e riproduttivi e dati aziendali riguardanti il management e le misure di biosicurezza applicate.

In totale, sono stati raccolti campioni di sangue da 2147 bovine di cui 598 sono risultati positivi a *N. caninum* evidenziando una prevalenza globale del 27,8%, con valori compresi tra 8,9% e 53,5% nelle aziende arruolate. Considerando i dati nel loro insieme, l'età media (in mesi) e il numero di lattazioni era maggiore negli animali positivi rispetto a quelli negativi (49,6 vs 47,2 e 2,18 vs 2,16, rispettivamente). Tale dato, indica che l'infezione negli allevamenti bovini lombardi è causata anche da una fonte esogena e non è sostenuta solo la trasmissione transplacentare.

Le performance riproduttive erano meno efficienti negli animali positivi rispetto a quelli negativi: infatti, è stato evidenziato un aumento del numero di inseminazioni e dei giorni in mungitura (1,9 vs 1,7 e 217,4 vs 196,8, rispettivamente). Il tasso di aborti riportato nelle vacche variava da 1 a più del 10% a seconda dell'azienda considerata. Analogamente, riguardo le performance produttive, in termini di produzione media giornaliera ed EVM, entrambi i parametri erano diminuiti negli animali positivi rispetto a quelli negativi (36,2 vs 36,5 e 12116,5 vs 12286,7).

Questi risultati preliminari indicano che negli allevamenti lombardi l'effetto di *N. caninum* non si limita all'aborto ma inficia anche le performance riproduttive e produttive delle bovine da latte.

Andamento delle variabili individuali misurate in bovine da latte provenienti da aziende lombarde positive all'infezione da *Neospora caninum*

| Variabile | Esito sierologico | Az. 1 | Az. 2 | Az. 3 | Az. 4 | Az. 5 | Az. 6 | Az. 7 | Az. 8 | Az. 9 | Az. 10 | Az. 11 |
|------------------------------|-------------------|---------|---------|--------|--------|--------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Età in mesi | Positivo | 51,1 | 44,1 | 55,1 | 54,9 | 51,2 | 47,2 | 47,7 | 49,8 | 48,8 | 48,9 | 53,3 |
| | Negativo | 50,7 | 38,8 | 54,1 | 70,1 | 50,3 | 49,0 | 43,0 | 41,8 | 43,2 | 46,0 | 48,5 |
| Numero di lattazioni | Positivo | 2,3 | 1,8 | 2,3 | 2,7 | 2,0 | 1,9 | 2,3 | 2,4 | - | 2,0 | 2,47 |
| | Negativo | 2,2 | 1,6 | 2,4 | 2,9 | 2,4 | 2,3 | 2,0 | 1,9 | - | 1,8 | 2,45 |
| Numero di inseminazioni | Positivo | 2,1 | 1,7 | 2,6 | 2,5 | 2,1 | 1,9 | 1,6 | 1,4 | 1,3 | 1,5 | 1,8 |
| | Negativo | 2,2 | 1,6 | 2,2 | 2,6 | 2,0 | 1,6 | 1,5 | 1,5 | 1,8 | 1,7 | 1,2 |
| Giorni in mungitura | Positivo | 184,1 | 263,2 | 275,8 | 224,9 | 207,8 | 215,1 | 175,9 | 205,9 | 191,1 | 257,2 | 248,5 |
| | Negativo | 210,4 | 215,8 | 222,4 | 215,8 | 144,7 | 198,9 | 179,1 | 185,3 | 244,0 | 235,9 | 186,3 |
| Produzione media giornaliera | Positivo | 40,4 | 31,0 | - | - | 35,2 | 33,2 | 40,4 | 39,3 | 39,6 | 32,9 | 34,5 |
| | Negativo | 39,9 | 33,6 | - | - | 37,3 | 35,5 | 40,6 | 40,7 | 33,0 | 33,8 | 33,7 |
| EVM | Positivo | 12464,9 | 11838,9 | 9906,4 | 8787,5 | - | 11922,7 | 14076,5 | 14121,5 | 12591,7 | 11583,6 | 12844,6 |
| | Negativo | 12130,8 | 12274,9 | 9843,3 | 8637,2 | - | 11700,0 | 13911,8 | 14085,8 | 12778,3 | 11595,2 | 12600,9 |
| Tasso di aborto % | | 9,6% | 12,7% | 13,5 | 9,1% | 8,4% | 4,7% | - | 4,0% | - | 2,0% | 1,0% |
| P% | | 19,8% | 19,1% | 31,7% | 53,5% | 41,0% | 34,4% | 24,6% | 35,1% | 49,5% | 19,5% | 8,9% |
| (N positivi/esaminati) | | 51/258 | 21/110 | 33/104 | 53/99 | 73/178 | 132/384 | 89/362 | 26/74 | 46/93 | 57/293 | 17/192 |

Casi di studio aziendale e fattori critici per *Neospora caninum*

Prendendo in considerazione i dati generali, gestionali, strutturali, produttivi, sanitari e biosicurezza delle aziende, è stato effettuato un confronto tra due aziende prese come esempio di caso studio per individuare i fattori critici per la circolazione e l'impatto di *N. caninum*.

In particolare, le aziende selezionate sono l'azienda 11 caratterizzata da una bassa prevalenza (17/192 P=8,9%) e l'azienda 6 con alta prevalenza del parassita (132/384, P=34,4%).

Entrambi gli allevamenti, siti in provincia di Cremona, erano caratterizzati da una conduzione convenzionale con management di tipo intensivo basati sulla razza Frisona Italiana; in entrambe si effettuava la fecondazione artificiale. La consistenza era di 390 (di cui 153 in lattazione) e 630 (di cui 329 in lattazione), rispettivamente. Nell'azienda 6, oltre ai bovini da latte, erano presenti anche suini. In entrambe le aziende era segnalata la presenza di cani, ma, questi, erano tenuti legati nell'azienda 11, mentre erano liberi nell'azienda 6.

Per quanto riguarda i fattori gestionali, la rimonta era interna in entrambe le aziende, in cui la quota era pari al 40%. L'alimentazione era unifeed con materie prime sia autoprodotte che acquistate, mentre l'acqua proveniva dal pozzo; nell'azienda 11, a differenza dell'azienda 6, erano condotte analisi qualitative standard sulle materie prime destinate agli animali. Sui terreni di produzione dei foraggi dell'azienda 6 era segnalata la presenza di cani. In nessuna delle aziende era utilizzato il pascolo per gli animali.

Considerando le caratteristiche strutturali, queste erano simili in entrambe le aziende. In particolare, la stabulazione era libera, le strutture erano coperte, e vi si effettuava il controllo del microclima. Tutte le strutture, comprese le mangiatoie e gli abbeveratoi, venivano pulite regolarmente. In nessuna delle due aziende vi era la sala parto. Alcune differenze riguardavano la pavimentazione, pieno nell'azienda 11 e grigliato con gomma nell'azienda 6, e la lettiera, di fibra di cocco in una e di paglia nell'altra, rispettivamente.

Per quanto concerne le performance aziendali, l'età alla prima fecondazione e al primo parto era pari a 15 e 25 mesi in entrambe le aziende. L'età media degli animali era più alta nell'azienda 6 rispetto alla 11 (4 vs 2,4 anni). Inoltre, il numero medio di interventi fecondativi per il concepimento era maggiore nell'azienda 6 rispetto all'azienda 11 (2,5 vs 1,9). È importante anche sottolineare che il tasso di aborti era dell'1% nell'azienda 11 mentre saliva fino al 5-10% nell'azienda 6. La produzione media giornaliera di latte era

inferiore nell'azienda 6 rispetto all'azienda 11 (35,4 vs 37,7); invece, il contenuto in proteine, grassi e cellule somatiche era simile.

Infine, riguardo ai parametri di sanitari e di biosicurezza, in entrambe le aziende si effettuavano i consueti piani di controllo, profilassi e le vaccinazioni per le malattie infettive, nonché trattamenti antiparassitari con eprinomectina. Non erano invece implementati piani di controllo per *Neospora*. In entrambe si eseguiva la lotta contro i roditori. Lo smaltimento di liquami, deiezioni e lettiere era efficiente in entrambe le aziende. Considerando invece alcune differenze, nell'azienda 6 gli aborti e le placente non erano correttamente smaltite e potevano quindi essere a disposizione dei cani aziendali. Inoltre, l'azienda 11, a differenza dell'azienda 6, era provvista di recinzione ed effettuava regolare disinfezione delle strutture e igienizzazione del personale.

In conclusione, nelle due aziende considerate sono state rilevate differenze in tutte le categorie di parametri presi in esame nonché nelle condizioni strutturali; inoltre, la gestione dell'ospite definitivo e le buone prassi igienico-sanitarie sono risultate cruciali per la circolazione e l'impatto della neosporosi nelle aziende.



2. La diagnosi dell'infezione da *Neospora caninum*

In che modo posso sapere se l'infezione da *Neospora caninum* è presente nella mandria?

L'aborto è la principale manifestazione clinica della neosporosi, ma in caso di morte precoce del feto si assiste al ritorno in calore della bovina. Pertanto, il sospetto che la neosporosi possa essere presente in azienda scaturisce sia dalla storia clinica della singola bovina che ha abortito sia dai dati riproduttivi aziendali indicanti episodi di riassorbimento fetale, casi di mummificazione, nascite premature o casi di nati-mortalità.

In caso di aborto, è opportuno combinare l'esame dei feti abortiti e la sierologia materna.

Sul feto abortito vengono utilizzate metodiche per la rilevazione del parassita, mentre sugli animali vivi si valuta l'infezione mediante la ricerca di anticorpi specifici nel sangue o nel latte (diagnosi sierologica). Un risultato sierologico positivo indica lo stato di infezione mentre un risultato negativo su un solo campione di un animale non indica necessariamente che il bovino sia esente dall'infezione. Questa possibilità dovrebbe essere considerata a maggior ragione se non c'è la possibilità di ripetere il test e soprattutto se si tratta di un animale che deve essere acquistato o di una rimonta.

Quali campioni servono per avere la diagnosi su casi di aborti?

Al fine di avere una diagnosi certa di aborto da *Neospora* è necessario inviare al laboratorio sia l'aborto che la placenta. Se in azienda si sono verificati più aborti è sicuramente auspicabile l'analisi multipla di più casi; ciò aumenta la probabilità di individuare il parassita. Le analisi possibili sono la ricerca molecolare del parassita e l'esame anatomo-patologico.

I campioni possono essere analizzati per la ricerca diretta del parassita mediante metodiche molecolari di PCR e RT-PCR (*Polimerase Chain Reaction*), altamente sensibile

e specifica. Per l'analisi deve essere prelevato l'intero feto con la placenta: l'encefalo rappresenta l'organo target per la ricerca del DNA parassitario ma possono essere utilizzati anche altri tessuti, come placenta, cuore, polmone, fegato. Il vantaggio di questa tecnica è legato al fatto che può essere impiegata anche su campioni che presentano fenomeni di autolisi e che potrebbero non essere idonei per l'esame anatomopatologico.

È importante sottolineare che la sola rilevazione molecolare del protozoo non indica necessariamente che esso sia responsabile di aborto; infatti, la certezza si ha mediante l'evidenziazione delle tipiche lesioni cerebrali di encefalite multifocale ed eventualmente l'associazione della positività molecolare del feto con quella sierologica della vacca abortente.

L'esame anatomo-patologico richiede la sottomissione al laboratorio del feto e della placenta. L'esame microscopico su porzioni di tessuto consente di individuare le cisti parassitarie e le lesioni specifiche caratterizzate da infiltrazioni cellulari.

Diagnosi sierologica

- ❖ La tecnica IFAT è la metodica sierologica di prima scelta utilizzata per diagnosticare la neosporosi nel bovino. Il principale vantaggio di questo test è legato al fatto che consente di ottenere non solo il dato di presenza di anticorpi anti-*Neospora* ma anche di determinarne la quantità, cioè il titolo anticorpale, e proprio per questo, spesso, viene utilizzato come esame di conferma in caso di risultati dubbi ottenuti con altre tecniche. Il limite maggiore di questa tecnica è che, essendo molto laboriosa, richiede un personale altamente qualificato.
- ❖ La tecnica ELISA, di cui in commercio sono disponibili diversi kit. I vantaggi sono il basso costo, la semplicità di esecuzione e la lettura oggettiva dei risultati ottenuti. Gli svantaggi sono legati ai fenomeni di cross-reattività con altri protozoi appartenenti alla famiglia Sarcocystidae, quali *Toxoplasma gondii*, *Besnoitia besnoiti* e *Sarcocystis* spp., e non consente di ottenere un titolo anticorpale definito, il che rende necessario l'utilizzo di un altro test diagnostico per quantificare gli anticorpi prodotti dall'animale. Oltre all'esame su siero, i test ELISA sono progettati per utilizzare come matrice il latte, individuale o di massa. In questo caso, i principali svantaggi sono dovuti alla comparsa tardiva degli anticorpi nel latte rispetto al siero e gli anticorpi sono circa 30 volte meno concentrati. Si calcola che all'interno del pool di latte debbano essere presenti almeno il 10-15% di animali sieropositivi nella mandria affinché il campione di latte possa risultare positivo al test. 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 di massa all'interno dell'allevamento.
- ❖ Il *Western Blot* (WB), è la metodica sierologica più utilizzata come test di conferma dei risultati positivi ottenuti con le precedenti tecniche. I limiti maggiori di questa tecnica sono quelli di richiedere molto tempo per l'esecuzione nonché un personale altamente qualificato.

Considerando che gli anticorpi anti-*N. caninum* subiscono fluttuazioni durante il periodo di gravidanza, è consigliato testare gli animali nella seconda metà della gestazione, quando i titoli anticorpali raggiungono il picco.

Quali test uso per diagnosticare l'infezione in una bovina?

Analisi sul sangue

È l'unico modo per determinare se i singoli animali o una mandria sono infetti da *Neospora*; il sangue viene utilizzato per ricercare tramite test sierologici gli anticorpi specifici per *Neospora*. Nell'animale vivo non è possibile cercare il parassita o i test finalizzati a questo scopo (es. analisi molecolari sul sangue) sono da ritenere inaffidabili in quanto la finestra temporale in cui vi sono tachizoiti circolanti è molto limitata.

Testare tutti gli animali darà un'indicazione della prevalenza dell'infezione all'interno di un allevamento.

I test sierologici attualmente disponibili possono dare risultati falsi negativi per una parte dei casi e quindi un singolo risultato del test non confermerà mai che un animale/allevamento è esente da *Neospora*.

Analisi sul latte

Sono stati sviluppati dei test che rilevano gli anticorpi nel latte di massa. Questo è un test solitamente utilizzato come strumento epidemiologico per determinare la proporzione di mandrie da latte che sono infette da *Neospora* in una area geografica.

Può essere impiegato sui singoli allevamenti per avere una indicazione rapida e semplice relativa alla presenza di *Neospora* all'interno della mandria. Il vantaggio di questo test è che non è invasivo e un solo test darà un risultato valido per l'intera mandria. Si consiglia di utilizzare il test per confermare se c'è un problema in un allevamento piuttosto che determinare se la mandria non è infetta.

Il test ha una scarsa sensibilità in quanto è in grado di rilevare la presenza di livelli significativi di anticorpi nel latte di massa, ma se gli animali infetti sono pochi i loro anticorpi vengono diluiti e non verranno rilevati dal test.

Che cosa indica il risultato del test?

Esame patologico eseguito su feto o placenta:

ESITO NEGATIVO

Un risultato negativo significa che non sono state rilevate lesioni specifiche in grado di dimostrare che l'aborto sia stato causato da *Neospora*. Questo succede se si esamina solo il feto. Infatti, le lesioni tipiche che indicano che l'aborto è causato da *Neospora* sono solitamente a carico dei cotiledoni placentari.

Un risultato negativo si può avere anche quando le condizioni del feto e della placenta al momento dell'esame anatomopatologico sono scadenti e non consentono di fare una diagnosi adeguata.

ESITO POSITIVO

Ciò significa che è stata rilevata almeno una lesione specifica da *Neospora* nel cervello fetale o nella placenta. Spesso questa osservazione è ulteriormente supportata dal rilevamento effettivo del parassita associato alle lesioni. In questi casi la diagnosi è abbastanza conclusiva che l'aborto sia stato causato da *Neospora*.

Esami sierologici sul feto o sulla madre:

ESITO NEGATIVO

Una sierologia negativa per *Neospora* significa che i test utilizzati non hanno rilevato sufficienti anticorpi specifici del parassita per dare un risultato positivo. Tuttavia, ciò non significa che un animale non sia infetto: i livelli di anticorpi specifici per *Neospora* fluttuano durante la vita di un animale infetto e, di conseguenza, un risultato negativo del test sierologico potrebbe rappresentare un falso negativo. Testare un animale in diverse fasi della sua vita, specialmente durante la gravidanza o intorno al parto, aumenterà la probabilità di ridurre i risultati negativi del test.

Nel caso di analisi sierologiche sul sangue fetale, dati sperimentali hanno dimostrato che il feto è in grado di produrre risposte anticorpali specifiche per *Neospora* dal centesimo giorno di gestazione in poi. Pertanto, un risultato negativo può verificarsi se si analizza il sangue di un feto di età inferiore a 100 giorni di gestazione, a causa dell'immaturità del suo sistema immunitario.

ESITO POSITIVO

Un risultato positivo al test anticorpale indicherà che l'animale è stato esposto al parassita e ha sviluppato una risposta immunitaria specifica a *Neospora*. Tale risultato conferma che l'animale è infetto, in quanto la produzione di anticorpi non è in grado di eliminare il parassita.

Un risultato sierologico positivo in una bovina che è stata testata subito dopo l'aborto non conferma che la causa dell'aborto sia riconducibile a *Neospora*. Infatti, molte bovine che si infettano nelle ultime fasi della gravidanza presentano anticorpi e partoriscono un vitello apparentemente sano ma congenitamente infetto da *Neospora*. Per avere questa informazione, occorre analizzare contemporaneamente anche l'aborto.

Un risultato sierologico positivo in un feto indicherà che il feto è stato esposto al parassita durante la gravidanza e ha elaborato una risposta immunitaria. In genere questo accade per i feti dal centesimo giorno di gestazione in poi quando hanno un sistema immunitario abbastanza maturo.

Qual è il periodo migliore per eseguire il test sulle bovine?

Il momento migliore per testare le bovine è solitamente durante o dopo un'infezione attiva da *Neospora* perché in questa fase l'animale avrà sufficienti anticorpi circolanti prodotti contro lo stadio attivo (tachizoite) del parassita ed è altamente probabile che il test darà un risultato positivo.

Quando il parassita è già incistato (stadio di bradizoite) e il sistema immunitario non riesce a individuarlo, i titoli anticorpali specifici contro la forma attiva del parassita diminuiscono, portando potenzialmente a risultati negativi del test.

Il momento migliore per eseguire il test per ridurre il rischio di ottenere un risultato falso negativo è durante la gravidanza, subito dopo un aborto o dopo una sospetta nuova infezione. Testare un animale più volte ridurrà il rischio di identificare erroneamente un animale come non infetto.

È necessario testare i vitelli?

I vitelli possono essere sottoposti a test sierologici, ma l'esito deve essere interpretato correttamente:

- ❖ Se un vitello viene testato alla nascita e risulta positivo per *Neospora*, gli anticorpi rilevati potrebbero derivare dalla madre ed essere stati assorbiti con il colostro. Tuttavia, se la madre presenta livelli elevati di anticorpi specifici per *Neospora* nel colostro, è anche molto probabile che il vitello sia infetto. Per essere sicuri che gli anticorpi siano stati prodotti dal vitello e non siano quelli del colostro, i vitelli dovrebbero essere sottoposti a prelievo di sangue prima della somministrazione di colostro.
- ❖ Un risultato negativo del test non è necessariamente un vero riflesso dello stato di infezione del vitello perché se un vitello è stato infettato in una fase precoce della gravidanza (<100 giorni di gestazione) potrebbe non essere stato in grado di riconoscere immunologicamente il parassita e non sviluppare anticorpi specifici per *Neospora*. Sebbene sia un evento raro, questi vitelli nascono negativi agli anticorpi ma sono infetti.

Strategie diagnostiche da utilizzare in funzione dell'obiettivo che si vuole raggiungere.

| Livello | Obiettivo | Tipo di test | Età animali | Esito |
|--------------------|--|--|---|---|
| ALLEVAMENTO | Screening di allevamento (in aziende prive di informazioni sullo stato di infezione) | ELISA su latte di massa | Tutti gli animali in lattazione | Se positivo l'infezione è presente ma non si può stabilire quanti sono gli animali infetti, il test individua solo le aziende con prevalenza di infezione di almeno 10-15%. Se negativo, l'infezione non può essere esclusa, in quanto una prevalenza minore del 10-15% non è riscontrabile. |
| | Piano di controllo (in aziende con infezione da <i>Neospora</i> già accertata) | IFAT o ELISA su siero | Superiore ai 6 mesi per evitare interferenze con anticorpi colostrali | Se positivo, si determina la proporzione di animali infetti (sieroprevalenza aziendale). Se negativo, l'infezione non può essere esclusa. In tal caso, si dovrebbero analizzare due campioni sequenziali per evitare falsi negativi dovuti alla fluttuazione anticorpale. |
| | Diagnosi su una serie di eventi abortivi | IFAT/ELISA su siero di 10 bovine con aborto e 10 che non hanno | Qualsiasi | Valutazione delle differenze fra i due gruppi. |

| | | | | |
|-------------|---|--|-----------|---|
| | | abortito di controllo | | |
| INDIVIDUALE | Diagnosi individuale (sulla singola bovina) | IFAT/ELISA su siero | Qualsiasi | <p>Positivo o negativo, titolo anticorpale se si utilizza IFAT.</p> <p>Se positivo, si conferma l'infezione.</p> <p>Se negativo, l'infezione è improbabile. È però possibile che si tratti di un falso negativo a causa della fluttuazione degli anticorpi; inoltre, potrebbero esserci fenomeni di immunotolleranza.</p> <p>Si dovrebbero analizzare campioni sequenziali per confermare l'assenza di infezione.</p> |
| | Valutazione di un singolo aborto | PCR su cervello feto e IFAT/ELISA su siero madre | Qualsiasi | <p>Se entrambi positivi, si conferma la trasmissione verticale dell'infezione.</p> |

Modificata da Ortega-Mora et al. 2007

3. Controllo dell'infezione da *Neospora caninum* e della neosporosi

Esiste un vaccino per *Neospora caninum*?

Ad oggi non esistono vaccini registrati per la neosporosi in Europa. In Italia non è registrato alcun vaccino nei confronti di *N. caninum*. I vaccini registrati in alcuni Paesi extra-europei hanno prodotto risultati contrastanti e non godono di elevata efficacia. Studi sperimentali hanno dimostrato che le capacità protettive dei vaccini anti-*Neospora* sono molto deboli.

Pertanto, l'unico modo per controllare la neosporosi è l'applicazione di misure igieniche e di programmi di controllo aziendali basati sulla gestione riproduttiva. Tutte le misure adottate devono tenere in considerazione la situazione epidemiologica nonché il rapporto costo-beneficio per l'allevamento.

Posso trattare gli animali infetti?

Non esistono molecole registrate per il trattamento della neosporosi del bovino. Non è stata provata l'efficacia di alcun farmaco nell'impedire la trasmissione congenita dell'infezione, sia nel cane che nel bovino. Studi *in vitro* hanno dimostrato una certa efficacia di alcune molecole nell'inibire parzialmente la moltiplicazione dei tachizoiti. In studi su bovini adulti è stata rilevata l'efficacia del toltrazuril di ridurre la probabilità di aborto da *Neospora*. Tuttavia, questa strada appare scarsamente applicabile considerando che l'uso di questa molecola non è consentito negli animali che producono latte per il consumo umano.

Dopo una "tempesta di aborti" cosa succede nella mandria negli anni successivi?

La cosiddetta "tempesta di aborti" è la manifestazione più devastante causata dall'infezione da *Neospora* in una mandria di bovini e di solito si verifica dopo un'infezione riconducibile a una origine primaria puntiforme, quale la contaminazione con oocisti del pascolo, del mangime o dell'acqua.

Di solito il numero di animali infetti è superiore rispetto a quelli che hanno abortito, poiché altre bovine non gravide o in una fase diversa della gravidanza al momento in cui si è verificata l'infezione potrebbero non aver mostrato segni clinici di malattia. Tuttavia,

alcuni di questi animali potranno abortire in una fase successiva o la loro progenie potrà abortire nelle gravidanze successive.

La maggior parte delle mandrie che hanno subito una “tempesta di aborti” vedranno la comparsa di un numero ridotto di aborti sporadici negli anni successivi. È possibile tuttavia che si verifichino altri episodi di “tempesta di aborti” legati a contaminazioni successive delle scorte di alimento o dell’acqua del bestiame con feci di cani infetti contenenti le oocisti.

È possibile liberarsi dell’infezione da *Neospora caninum* una volta che è entrata nella mandria?

Non ci sono prove di una trasmissione diretta del parassita tra i bovini, se non dalla madre al vitello durante la gravidanza. Ciò significa che la principale via attraverso la quale i bovini possono essere infettati da *Neospora* dopo la nascita è l’ingestione di oocisti che sono state escrete nelle feci di un cane infetto e che successivamente nell’ambiente sono diventate infettanti. A seguito di queste modalità di trasmissione, non vi è alcun pericolo diretto derivante dal mantenere le bovine infette con quelle non infette. Ciò offre agli allevatori più tempo per sviluppare strategie di controllo, senza la necessità di abbattere immediatamente gli animali infetti.

Dovrebbero essere implementate le misure di biosicurezza in modo da impedire ai cani di accedere alle aree del bestiame, in particolare ai luoghi in cui sono mantenute le bovine gravide e alle aree designate per il parto. Questo consente di prevenire l’infezione del cane. Inoltre, i cani non dovrebbero accedere alle aree in cui viene conservato l’alimento per il bestiame ed è anche importante assicurarsi che le feci del cane non possano contaminare il mangime o l’acqua potabile. Un’altra misura che è stata suggerita è un buon controllo dei roditori, in quanto possono essere infettati da *Neospora* e fungere da serbatoio di infezione per i cani.

L’adozione di piani di controllo perseguiti con costanza nel tempo porterà a evidenti effetti positivi sulla riduzione del numero di bovine infette. Tuttavia, l’assenza di molecole attive contro *Neospora* e di vaccini ne impedisce l’eradicazione, che è possibile solo con l’eliminazione degli animali infetti. Questa via non è economicamente perseguibile nella maggioranza dei casi e può essere indicata solo quando la percentuale di animali infetti è molto limitata. Si può adottare una strategia di controllo basata sul mantenimento in azienda degli animali che nascono da bovine negative e dalla eliminazione di quelle positive, tenendo conto della loro produttività.

Devo eliminare le bovine positive?

L'eliminazione di tutti gli animali infetti da un allevamento di solito non è un'opzione praticabile e dipende dalla proporzione di animali infetti all'interno di un allevamento e anche dal tipo di allevamento (ad esempio se per l'azienda la vendita di animali rappresenta un introito economico rilevante).

Per alcuni allevatori che hanno una mandria dall'elevato valore genetico potrebbe essere accettabile eliminare una proporzione maggiore di animali per poter rivendicare lo stato di assenza di infezione da *Neospora* in caso di vendita del bestiame.

In generale, la decisione dell'allevatore di eliminare gli animali positivi potrebbe essere basata sulla produttività delle bovine, considerando che non c'è trasmissione tra bovini adulti. Ciò, insieme all'adozione di altre misure, come ad esempio la strategia di eliminare dalla riproduzione le vitelle nate da madri positive, consentirà di ridurre al minimo l'impatto della malattia. Questo tipo di approccio, basato sulla selezione di riproduttori da animali non infetti e sull'utilizzo della loro prole come stock sostitutivo degli animali infetti e meno produttivi, è lento e deve essere perseguito per un tempo prolungato.

Quali sono le misure di biosicurezza che posso adottare per controllare l'infezione da *Neospora caninum*?

1. Acquistare animali da allevamenti indenni. Dal momento che, ad oggi, non esistono piani di certificazione di allevamenti indenni, si raccomanda la verifica dello stato sanitario degli animali che si vogliono acquistare effettuando opportuni test sierologici e introdurre solamente gli animali risultati sieronegativi all'infezione da *Neospora*.
2. Utilizzare rimonte nate da bovine non infette. Aiuterà a mantenere il parassita lontano dalla mandria.
3. Garantire un corretto smaltimento dei feti abortiti e degli annessi fetali per evitare l'infezione dei cani eventualmente presenti in azienda e di altri animali (roditori o animali selvatici).
4. Vietare l'accesso dei cani negli spazi destinati al ricovero degli animali e nelle sale parto per evitare che si infettino ingerendo involgii fetali e placenti.
5. Non dare da mangiare carne cruda ai cani aziendali per evitare che si infettino.
6. Impedire l'accesso ai cani nei luoghi dove sono conservati gli alimenti per gli animali per evitare che possa essere contaminato con le loro feci. Per lo stesso motivo impedire l'accesso ai cani ai paddock o pascoli.

7. Impedire l'accesso ai cani all'acqua di abbeverata per evitare che possa essere contaminata dalle feci dei cani infetti e limitare quindi l'infezione dei bovini attraverso l'acqua. Le oocisti di *Neospora* possono sopravvivere diversi mesi nell'acqua.
8. Se possibile, eliminare correttamente le feci dei cani e evitare la loro dispersione nell'ambiente.
9. Controllare le specie infestanti, come i roditori e gli insetti, mediante l'adozione di piani di disinfestazione. I roditori potrebbero essere, non solo ospiti intermedi ma anche reservoir del parassita; il loro controllo riduce il rischio potenziale di infezione.
10. Regolamentare l'accesso in azienda, per esempio dotando l'azienda di adeguate recinzioni e cancelli che limitino l'ingresso di persone estranee.
11. Nei terreni aziendali o viali vicini all'azienda frequentati da cani di proprietà, inserire indicazioni affinché i proprietari raccolgano le feci dei propri animali e quindi si possa prevenire l'infezione nei bovini.



Pratiche di gestione aziendale per il controllo dell'infezione da *Neospora caninum*.

L'adozione di buone pratiche di gestione aziendale dovrebbe essere condizione imprescindibile in ogni azienda di bovine da latte, indipendentemente dalla presenza di infezione da *Neospora caninum*. Nel caso di assenza di infezione, le buone pratiche aiuteranno a prevenire l'introduzione del parassita in azienda. Se il parassita è già presente, ne limiteranno l'ulteriore diffusione tra gli animali.

Le buone pratiche devono essere incentrate sul cane, finalizzate a impedire la sua infezione e a prevenire la contaminazione di acqua ed alimenti per i bovini con le sue feci. Il controllo dell'infezione del cane aziendale è uno dei principali strumenti per controllare la circolazione dell'infezione nei bovini.

Prevenzione dell'infezione nel cane:

Si ottiene impedendo l'accesso dei cani ai paddock dove sono mantenuti i bovini e, soprattutto, alle sale parto per evitare che possano ingerire placente e involgini fetali che rappresentano la principale via di infezione per il cane. Inoltre, è buona prassi non dare da mangiare carne cruda ai cani, che potrebbe essere infetta, e applicare strategie di controllo dei roditori che, se infetti da *Neospora*, potrebbero costituire un reservoir del parassita per i cani.

Prevenzione della contaminazione di acqua ed alimenti con feci di cane:

È il secondo livello di interventi che dovrebbero essere adottati per prevenire/controllare l'infezione dei bovini. Si basano sulla limitazione dell'accesso dei cani ai pascoli e ai locali dove vengono conservati gli alimenti per i bovini che dovrebbero essere, se all'aperto, ben coperti. Parimenti, deve essere limitato il loro accesso alle acque da bere dei bovini per evitare la contaminazione con le loro feci. Il rischio per i bovini deriva non solo dai cani aziendali ma anche da cani estranei all'azienda, occorre, quindi, limitare anche il loro ruolo nella trasmissione dell'infezione ai bovini. A tal fine, l'unica strada possibile è quella di indurre i proprietari di questi animali a non far passeggiare i propri cani nelle aree aziendali e a raccogliere le feci dei propri cani. Inoltre, bisognerebbe evitare il pascolamento dei terreni aziendali da parte di pecore transumanti, in quanto i cani da pastore al seguito delle greggi potrebbero essere infetti.

Prevenzione dell'introduzione di *Neospora* nell'azienda:

In aggiunta al controllo sulle feci canine, la riduzione del rischio di introduzione di *Neospora* in un'azienda si ottiene mantenendo l'azienda "chiusa". In realtà, non sempre è possibile evitare l'introduzione di nuovi animali in azienda, perché talvolta si rende necessario acquistare delle rimonte esterne. In questi casi sarebbe opportuno rifornirsi da aziende note per avere un buon stato sanitario degli animali e, se possibile, richiedere o eseguire dei test sierologici sugli animali da acquistare per appurare lo stato di infezione dei bovini che si vogliono introdurre.

L'ingresso di bovini infetti in azienda non rappresenta un rischio per gli altri bovini, ma se dovessero abortire produrrebbero materiale che può causare l'infezione del cane aziendale. Inoltre, se partoriscono a termine producono vitelli apparentemente sani ma infetti, contribuendo ad aumentare il numero di animali infetti nella mandria.



Come posso ridurre gli effetti economici legati all'infezione da *Neospora caninum*

Al fine di capire cosa fare in azienda e minimizzare l'impatto della neosporosi, è necessario stabilire l'entità del problema, determinando la sieroprevalenza intra-aziendale, nonché il tasso di aborti. Infatti, i due principali obiettivi da raggiungere all'interno di un allevamento infetto sono la riduzione della prevalenza dell'infezione e la prevenzione degli aborti. Si procede, quindi, con l'esecuzione di test sierologici su tutte le vacche di età superiore ai sei mesi e con la registrazione del numero di aborti. Inoltre, è di fondamentale importanza consegnare i feti abortiti al laboratorio diagnostico per identificare l'agente causale, ricercando *N. caninum* mediante metodiche molecolari sul feto e gli invogli fetali.

A seconda dell'esito dello screening sierologico, sarà differente la scelta del tipo di intervento sugli animali infetti (se eliminarli o se intervenire in altro modo).

Contemporaneamente, devono essere adottate le misure di biosicurezza per portare al minimo il rischio di nuove infezioni dovute alle oocisti disseminate dai cani infetti.

Dopo aver eliminato/ridotto il rischio di nuove infezioni all'interno della mandria, può iniziare un lento processo di eliminazione dell'infezione all'interno della mandria, scegliendo i capi da rimonta nati dagli animali non infetti da *Neospora* ed eliminando nel tempo i bovini infetti meno produttivi.

Al fine di ridurre al minimo le perdite derivanti dalla presenza di un numero rilevante di bovine infette da *Neospora*, è possibile fecondare le bovine infette con tori da carne o utilizzare il seme di toro da carne nei programmi di inseminazione. Da una parte tale tipo di intervento riduce il numero di aborti, dall'altra i vitelli nati da queste bovine, avendo un valore economico maggiore, in quanto possono essere venduti come animali da carne, contribuiscono a ridurre le perdite economiche.

In generale, occorre mantenere un elevato stato di benessere degli animali, controllando le eventuali infezioni intercorrenti in modo da ridurre i casi di trasmissione madre-feto.

Valutazione del rischio e strategie di controllo

| Fattore di rischio | Strategia di controllo |
|--|--|
| Presenza di cani in allevamento | No accesso dei cani alla sala parto. No cucciolate in allevamento. No ingresso di cani estranei/animali selvatici. |
| Contaminazione fecale di alimenti o acqua | Non controllabile se l'alimento è acquistato dall'esterno. In azienda è possibile stoccare i foraggi al riparo, lontano dalle contaminazioni, e controllare adeguatamente l'acqua di abbeverata. |
| Contaminazione del pascolo | Non controllabile, possibile utilizzo di recinzioni. |
| Introduzione di nuovi animali potenzialmente infetti | Test sierologico in ingresso. Introduzione di animali provenienti da allevamenti sieronegativi. |

Programmi di controllo della neosporosi

1. Test and cull: consiste nel testare tutti gli animali presenti in allevamento mediante sierologia e nell'eliminare tutti i sieropositivi a fine lattazione, sostituendoli con rimonta esterna certificata. È una strategia efficace nel breve termine ma economicamente poco sostenibile.

2. Fecondazione con seme di toro da carne, preferibilmente di razza limousine o piemontese. In queste razze è stata, infatti, dimostrata una maggior resistenza all'infezione e l'inseminazione con toro da carne consente di avere un minor rischio di aborto dovuto a *N. caninum* rispetto alla fecondazione in purezza. Inoltre, i vitelli nati da queste bovine sono venduti e destinati all'ingrasso perciò non rimangono in azienda con il rischio che diventino responsabili del mantenimento dell'infezione.

Tutti gli animali vengono testati sierologicamente e i capi sieropositivi di cui si vuole mantenere la produzione lattea anche per le lattazioni successive, vengono inseminati con tori da carne.

3. Embryo-transfer su bovine riceventi sieronegative, nel caso di bovine di alta genealogia. Il trasferimento di embrioni da vacche sieropositive di alto valore genetico a riceventi sieronegative si è dimostrato un metodo efficace nel prevenire la trasmissione verticale per non perdere la rimonta derivante da animali sieropositivi di elevato valore genetico. In questo caso si devono controllare tutte le vacche recipienti prima dell'*embryo-transfer*, considerando che la trasmissione transplacentare inizia a 21 giorni.

4. Doing nothing: alcuni allevatori adottano questa strategia, ovvero "il non fare nulla" aspettando che *Neospora caninum* svolga il suo ciclo all'interno dell'allevamento. Si assiste, quindi, ad una fase iniziale, appena dopo l'entrata del protozoo in azienda, caratterizzata da un elevato numero di aborti; e ad un periodo successivo in cui la mandria sviluppa una copertura anticorpale maggiore e la prevalenza degli aborti si riduce stabilizzandosi sotto il 10%.

Interventi attuabili in relazione all'esito dell'esame sierologico

| Esito esame sierologico | Genealogia | Intervento |
|-------------------------|------------|--|
| Vacche sieropositive | Buona | Riforma a fine lattazione, sostituzione con rimonta esterna certificata. |
| Vacche sieropositive | Alta | Fecondazione con seme di toro da carne. |
| Vacche sieropositive | Eccellente | <i>Embryo-transfer</i> su vacche riceventi sieronegative. |
| Vacche sieronegative | Qualsiasi | Mantenimento in azienda come rimonta interna. |

Conclusioni

Le attività di informazione e dimostrazione intraprese nell'ambito del progetto "DEMONE" hanno consentito da una parte di incontrare tecnici e allevatori, e, dall'altra, di collezionare dati, delineando un quadro esaustivo della situazione degli allevamenti lombardi rispetto all'infezione da *Neospora*.

In particolare, il progetto "DEMONE" ha messo in evidenza alcuni punti critici, dimostrando l'esistenza di una situazione di scarsa consapevolezza degli effetti dell'infezione da *Neospora*. La maggior parte degli allevatori associa l'infezione da *Neospora* principalmente all'aborto, mentre la possibilità che il parassita agisca già nelle prime fasi determinando riassorbimenti embrionali non è considerata. D'altra parte, il progetto ha consentito di rilevare che negli allevamenti lombardi l'infezione da *Neospora* può impattare anche all'inizio della gestazione, oltre che influire sulla produttività inficiando gli sforzi di miglioramento genetico che molte aziende intraprendono.

Sono stati individuati, grazie ai dati raccolti, comportamenti irrazionali in numerose aziende, che testimoniano la scarsa conoscenza dei meccanismi di propagazione dell'infezione in azienda. Spesso, viene sottostimata l'evenienza che l'ingresso dell'infezione in azienda possa essere riconducibile ad alimenti acquistati e contaminati già alla produzione. A questo riguardo, le analisi sierologiche di oltre 2000 campioni di siero di bovine provenienti da 11 aziende dimostrano che nei nostri allevamenti esiste un effettivo rischio di infezione esogena e che la presenza di *Neospora* in azienda non è legata solo alla presenza di bovine infette che producono rimonte a loro volta infette.

Tra i comportamenti negativi molto diffusi, è da sottolineare la scarsa propensione ad approfondire le cause degli aborti impedendo il riconoscimento di *Neospora* quale agente eziologico.

L'insieme di queste criticità ostacola molte aziende dall'intraprendere piani di controllo della neosporosi che porterebbero effettivi benefici in termini di produttività.

A tal proposito, questo piccolo volume potrebbe essere uno strumento pratico in grado di dare un apporto.

Ringraziamenti

Si ringraziano gli allevatori e in particolare le aziende dimostrative che, acconsentendo di effettuare i prelievi e rispondendo al questionario, hanno permesso l'attuazione del progetto.

Voci bibliografiche

- Almería S., López-Gatius, F. (2013). Bovine neosporosis: Clinical and practical aspects. *Research in Veterinary Science* 95:303- 309.
- Calero-Bernal R., Horcajo P., Hernández M., Ortega-Mora L.M., Fuentes, I. (2019). Absence of *Neospora caninum* DNA in human clinical samples, Spain. *Emerging Infectious Diseases* 25(6):1226- 122.
- Collantes-Fernandez E., Rodriguez-Bertos A., Arnaiz-Seco I. (2006). Influence of the stage of pregnancy on *Neospora caninum* distribution, parasite loads and lesions in aborted bovine fetuses. *Theriogenology* 65:629-641.
- Dubey J.P., Schares G., Ortega-Mora L.M. (2007). Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. *Clinical Microbiology Reviews* (2):323-367.
- Fávero J.F., Da Silva A.S., Campigotto G., Machado G., Daniel de Barros L., Garcia J.L., Vogel F.F., Mendes R.E., Stefani L.M. (2017). Risk factors for *Neospora caninum* infection in dairy cattle and their possible cause-effect relation for disease. *Microbial Pathogenesis* 110:202-207.
- Gondim L.F.P., McAllister M.M., Mateus-Pinilla N.E., Pitt W.C., Mech L.D., Nelson M. E. (2004). Transmission of *Neospora caninum* between wild and domestic animals. *Journal of Parasitology* 90:1361-5.
- Guido S., Katzer F., Nanjiani I., Milne E., Innes E.A. (2016). Serology-based diagnostics for the control of bovine neosporosis. *Trends in Parasitology*, 32:131-143.
- Horcajo P., Regidor-Cerrillo J., Aguado-Martínez A., Hemphill A., Ortega-Mora L.M. (2016). Vaccines for bovine neosporosis: current status and key aspects for development. *Parasite Immunology* 17.
- Jenkins M.C., Parker C., Hill D., Pinckney R.D., Dyer R., Dubey J.P. (2007). *Neospora caninum* detected in feral rodents. *Veterinary Parasitology* 143:161-5.
- Lindsay D.S., Dubey J.P., Duncan R.B. (1999). Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. *Veterinary Parasitology* 82:327-333.
- McAllister M.M. (2016). Diagnosis and Control of Bovine Neosporosis. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice* 32:443-63.
- Ortega-Mora L.M., Gottstein B., Conraths F.J., Buxton D. (2007). Protozoal abortion in farm ruminants. Guidelines for diagnosis and control. CAB International press.

Otranto D., Lazzari A., Testini G., Traversa D., Frangipane di Regalbono A., Badan M., Capelli G. (2003). Seroprevalence and associated risk factors of neosporosis in beef and dairy cattle in Italy. *Veterinary Parasitology* 118:7-18.

Perrucci S., Gavazza, A. Rocchigiani G., Nardoni S., Zbriger A., Lubas G., Mancianti F. (2017). *Neospora caninum* oocyst shedding in a naturally infected dog from Italy. *Veterinary Parasitology Regional Studies and Reports* 8:10-12.

Regidor-Cerrillo J., Horcajo P., Ceglie L., Schiavon E., Ortega-Mora L.M., Natale A. (2020). Genetic characterization of *Neospora caninum* from Northern Italian cattle reveals high diversity in European *Neospora caninum* populations. *Parasitology Research* 119:1353-1362.

Reichel M.P., Alejandra Ayanegui-Alcérreca M., Gondim L.F.P., Ellis J. T. (2013). What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle - The billion dollar question. *International Journal for Parasitology* 43:133-42.

Sala G., Gazzonis A., Boccardo A., Coppoletta E., Galasso C., Manfredi M.T., Pravettoni D. (2018). Using beef-breed semen in seropositive dams for the control of bovine neosporosis. *Preventive Veterinary Medicine* 161:127-133.

Schares G., Pantchev N., Barutzki D., Heydorn A.O., Bauer C., Conraths, F.J. (2005). Oocysts of *Neospora caninum*, *Hammondia heydorni*, *Toxoplasma gondii* and *Hammondia hammondi* in faeces collected from dogs in Germany. *International Journal for Parasitology* 35:1525-37.

Schares G., Rauser M., Zimmer K., Peters M., Wurm R., Dubey J.P., De Graaf D.C., Edelhofer R., Mertens C., Hess G., Conraths FG. (1999). Serological differences in *Neospora caninum* associated epidemic and endemic abortions. *The Journal of Parasitology* 85:688-694.

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. *Parasitology Research*, 98:264-267.

Villa L., Maksimov P., Luttermann C., Tuschy M., Gazzonis A.L., Zanzani S.A., Mortarino M., Conraths F.J., Manfredi M.T., Schares G. (2021). Spatial distance between sites of sampling associated with genetic variation among *Neospora caninum* in aborted bovine foetuses from northern Italy. *Parasites and Vectors* 14:47.