



**UNIVERSITÀ  
DI PARMA**

Dipartimento di Scienze Medico-Veterinarie

Corso di Laurea Magistrale a Ciclo Unico in Medicina Veterinaria

**Analisi della sieroprevalenza di *N. caninum* e *T. gondii*  
negli allevamenti ovicaprini della regione Emilia-  
Romagna (Italia)**

**Analysis of the seroprevalence of *N. caninum* and *T.*  
*gondii* in sheep and goat breeding of Emilia-Romagna  
(Italy)**

Relatore: Prof.ssa Laura Hellen Kramer

Correlatore: Dott.ssa Alice Vismarra

Laureanda: Ester Frassine

ANNO ACCADEMICO 2021/2022



## Abstract

Neosporosis is recognized as one of the main causes of abortion in cattle worldwide but can also cause abortion and reproductive failure in sheep and goats. Its role in ovine reproductive losses is increasing but the knowledge about the epidemiology of neosporosis in sheep and goats is still limited. Moreover, ovine neosporosis might be more prevalent than initially thought and the global epidemiological evidence confirms that ovine neosporosis is a worldwide emerging disease, potentially dangerous especially for those country that mainly breed sheep and goat. In Italy, no official controls for *N. caninum* are applied. All seroprevalence data available come from local studies, but no data were available for Emilia-Romagna region. This study aimed to estimate the pooled seroprevalence of *N. caninum* in the Emilia-Romagna region (Italy) together with comparison with seroprevalence of *T. gondii* in order to evaluate the differences of this two parasite incidence and distribution. Twenty-four herds for a total of 100 sheep and 25 goats (125 animal in total) were included. The seroprevalence of *N. caninum* was estimated to be 4.8% (3% in sheep and 12% in goat) while the seroprevalence of *T. gondii* was estimated to be 32% (39% in sheep and 4% in goats) using serological methods (test ELISA: Test Neospora caninum Ab - IDEXX Neospora; Test IDEXX Toxotest Ab). All the sieropositive sheep came from the province of Ravenna while all the seropositive goats came from the province of Forlì-Cesena. The present results show a relatively low seroprevalence of *N. caninum* infection in sheep and a high seroprevalence of *T. gondii* infection in the same ovine population. The present results also show a relatively high seroprevalence of *N. caninum* infection in goats and a low seroprevalence of *T. gondii* infection in the same caprine population.



# Sommario

Abstract.....	3
Abbreviazioni.....	7
Introduzione generale.....	9
<b>1. PARTE GENERALE: Neospora caninum.....</b>	<b>11</b>
1.1 Caratteristiche generali di <i>N. caninum</i> .....	12
1.2 Tassonomia.....	15
1.3 Struttura e caratteristiche morfologiche.....	17
1.4 Ciclo biologico.....	20
1.5 Epidemiologia.....	25
1.6 Patogenesi, segni clinici e rilievi patologici.....	30
1.7 Diagnosi.....	35
1.8 Prevenzione profilassi e terapia.....	39
<b>2. PARTE GENERALE: Toxoplasma gondii.....</b>	<b>41</b>
2.1 Caratteristiche generali di <i>T. gondii</i> .....	42
2.2 Tassonomia.....	43
2.3 Struttura e caratteristiche morfologiche.....	44
2.4 Ciclo biologico.....	46
2.5 Epidemiologia.....	49
2.6 Patogenesi, segni clinici e rilievi patologici.....	51
2.7 Diagnosi.....	53
2.8 Prevenzione, profilassi e terapia.....	55
<b>3. PARTE SPERIMENTALE.....</b>	<b>57</b>
3.1 Materiali e metodi.....	57
3.1.1 Campionamento.....	57
3.1.2 Analisi sierologiche.....	58
3.1.3 Sensibilità e Specificità.....	60
3.1.4 Procedura.....	60
3.2 Risultati.....	67
3.2.1 Distribuzione geografica.....	67
3.2.2 Analisi sierologica.....	68

<b>4. DISCUSSIONE.....</b>	<b>75</b>
<b>5. CONCLUSIONI.....</b>	<b>79</b>
<b>Bibliografia.....</b>	<b>81</b>
<b>Sitografia.....</b>	<b>91</b>

## Abbreviazioni

SNC = sistema nervoso centrale

Sp = specificità

Se = sensibilità

IgM = immunoglobuline M

IgG = immunoglobuline G

rDNA = DNA ribosomiale

18S = subunità 18

28S = subunità 28

ITS1 = *intertranscribed spacer region 1*

BPA-1 = Isolato bovino di *N. caninum* 1

NC-1 = Isolato di *N. caninum* 1

NC-2 = Isolato di *N. caninum* 2

NC-3 = Isolato di *N. caninum* 3

NC-Liv = Isolato di *N. caninum* Liverpool

NC-LivB1 = Isolato di *N. caninum* Liverpool B1

Nc-Spain7 = Isolato di *N. caninum* Spagnolo 7

NC-SweB1 = Isolato di *N. caninum* Svedese

JPA-2 = Isolato di *N. caninum* Giapponese 2

IFN- $\gamma$  = Interferon gamma

Th1 = T-helper di tipo 1

Th2 = T-hepler di tipo 2



## Introduzione generale

*Neospora caninum* è un protozoo intracellulare obbligato che colpisce sia gli animali da reddito sia gli animali da compagnia, causando disturbi riproduttivi nei bovini e malattie neurologiche nei cani.

Scoperta per la prima volta nel 1989 come agente di aborto nella specie bovina, *N. caninum* è diventata ben presto nota per il suo impatto economico negli allevamenti di ruminanti come causa di aborto e di natimortalità.

Oggi è considerato uno dei principali patogeni abortigeni nei bovini e il suo ruolo abortivo nella sindrome riproduttiva di pecore e capre è in aumento (Mendoza-Morales et al., 2022).

La sua reale prevalenza nei piccoli ruminanti è sottostimata e ancora sconosciuta. Alcuni studi dimostrano che la neosporosi ovina potrebbe essere più diffusa di quanto si pensasse inizialmente (Benavides et al., 2022).

In Italia, non essendo mai stati applicati piani di controllo ufficiali né nei bovini né tantomeno nei piccoli ruminanti, i dati di sieroprevalenza sono noti solo per via di studi locali, che presentano ampie variabilità nei risultati (la sieroprevalenza bovina individuale varia dal 22% al 64%; la sieroprevalenza aziendale dal 55% al 77%; quella ovina individuale varia dal 2,18% al 44% mentre non vi sono dati aggiornati per l'Italia in merito alla sieroprevalenza aziendale) dovute ai metodi diagnostici utilizzati, al tipo di allevamento, alla valutazione condotta (Gaffuri et al., 2006) (IZSve Linee Guida, 2017) (Mendoza-Morales et al., 2022). Una stima del 2014 rivela che il rischio di aborto nelle bovine sieropositive è da 2 a 3,5 volte superiore rispetto alle bovine sieronegative. In Lombardia è stata riscontrata una prevalenza individuale del 29,3%, dato ottenuto mediante PCR e ricerca diretta nei feti abortiti (Magnino et al, 2001), in Sardegna il tasso di prevalenza individuale indagato con IFAT è del 64% (Masala et al., 2000), in Sicilia del 26,2% (ELISA) (Cascone et al., 2002), in Veneto è compresa tra il 22% e il 43,2% (Nardelli et al., 2005).

Questa ricerca si propone l'obiettivo di studiare la sieroprevalenza di *N. caninum* nella popolazione di pecore e capre della zona Emilia-Romagna e di confrontarla con la prevalenza di *Toxoplasma gondii*, considerando come oggetto di studio gli stessi animali e la stessa area geografica.



# 1. PARTE GENERALE: *Neospora caninum*

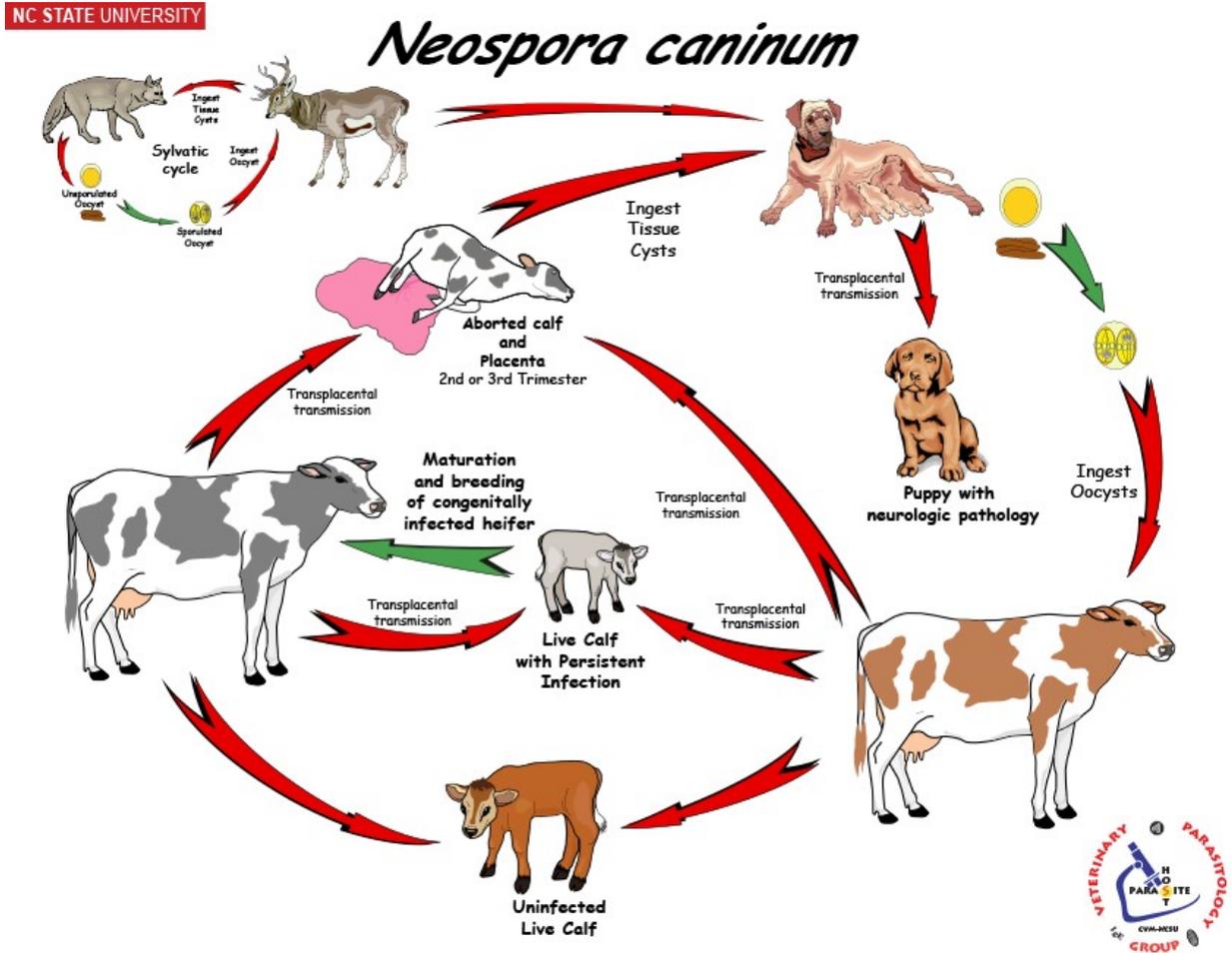


Figura 1. Ciclo biologico di *N. caninum* (fonte: NCSU veterinary parasitology [https://parasitology.cvm.ncsu.edu/life\\_cycles/protozoa/neospora\\_all.html](https://parasitology.cvm.ncsu.edu/life_cycles/protozoa/neospora_all.html)).

2.

## 1.1 Caratteristiche generali di *N. caninum*

### Storia

Erroneamente identificato come *Toxoplasma gondii* a causa della loro somiglianza dal punto di vista morfologico e strutturale nonché delle lesioni indotte (Dubey, 1999), *N. caninum* fu osservato nel 1984 come "sporozoo formante cisti non identificato (*cyst-forming sporozoon*)" nel sistema nervoso centrale e nei muscoli scheletrici di cani che presentavano disturbi neurologici quali encefalomielite e miosite (Bjerkås et al., 1984). Questo "parassita *Toxoplasma-like*" è stato dimostrato per la prima volta essere causa di malattia neurologica in sei cani norvegesi infettati congenitamente quello stesso anno senza ancora sapere con certezza se fosse lo stesso parassita osservato anni prima nelle pecore o meno (Bjerkås et al., 1984). Nel 1984 i ricercatori sospettarono fin da subito che si trattasse di un parassita diverso sia da *T. gondii* che da tutti gli sporozoi osservati fino a quel momento. La ricerca del 1999 ha infatti evidenziato alcune differenze tra i due parassiti quali caratteristiche ultrastrutturali dei merozoiti e sede del ciclo schizogonico. Inoltre, nei campioni analizzati fu anche riscontrata una bassa prevalenza di anticorpi per *T. gondii*. Tutte queste prove hanno portato i ricercatori a sostenere la tesi che il parassita osservato fosse un nuovo parassita non ancora descritto (Hartley e Blakmore, 1974).

Solo nel 1991 Bjerkås e Dubey dimostrarono che *N. caninum* era lo stesso parassita *Toxoplasma-like* studiato da Bjerkås nei cani norvegesi (Bjerkås e Dubey, 1991).

Quattro anni dopo, nel 1988, il nuovo parassita fu denominato "*Neospora caninum*": "*Neo*" da "*new*", "*spora*" dall'evidenza che era uno sporozoo e "*caninum*" perché la prima scoperta è avvenuta nei cani norvegesi. *N. caninum* è stato riconosciuto come strutturalmente distinto da *T. gondii* e appartenente a un nuovo genere e a una nuova specie (Dubey et al., 1988). Esiste infatti un forte polimorfismo tra i due sporozoi: Brindley notò che i tre loci genetici B1, p22 e p30 di *T. gondii* e i relativi antigeni erano assenti in *N. caninum* (Brindley et al, 1993). Nonostante i due parassiti abbiano in comune numerosi antigeni minori, sono stati scoperti quattro antigeni maggiori (17, 29, 30 e 37 KDa) di *N. caninum* che si presentano geneticamente e immunologicamente differenti da quelli di *T. gondii* (Dubey and Lindsay, 1996). Inoltre, al microscopio elettronico i "rhoptries" di *N. caninum* appaiono elettrondensi mentre quelli di *T. gondii* elettronlucidi. Al microscopio elettronico è evidente la differenza dello spessore della

parete della cisti tissutale che nel caso di *N. caninum* è più spessa, circa 4 µm, mentre nel caso di *T. gondii* è più sottile, <1 µm (Dubey and Lindsay, 1996). Anche l'affinità per i glicosamminoglicani della superficie della cellula ospite, utili per il processo di adesione e invasione, è differente: *N. caninum* si lega con proteoglicani di condroitinsolfato mentre *T. gondii* predilige i residui di eparansolfato (Buxton et al., 2002).

Riconosciuto ufficialmente come causa di malattia protozoaria fatale nei cani nel 1988, è stato riscontrato che *N. caninum* forma cisti soprattutto nel cervello e nel midollo spinale dei cani, ma anche in altri tessuti. È inoltre stato confermato che le principali lesioni associate a *N. caninum* sono meningoencefalomielite e miosite (Dubey et al., 1988).

*N. caninum* è stato osservato anche nei cavalli. Infatti, i tachizoiti di *N. caninum* sono stati trovati in sezioni di polmoni di un feto equino abortito 2 mesi prima del termine (Dubey e Porterfield, 1990). Questo parassita è stato chiamato "*Neospora hughesi*" e si è scoperto essere strettamente correlato a *N. caninum*, ma pur sempre separato e unico da esso (Marsh et al., 1999). *N. hughesi* è causa di mieloencefalite protozoaria equina (EPM), ma con una prevalenza inferiore rispetto a *Sarcocystis neurona* (Marsh et al., 1999).

*N. caninum* è stato osservato al microscopio e isolato in colture cellulari dopo esser stato prelevato da feci di cuccioli di Labrador retriever congenitamente infetti nel 1988 (Dubey et al., 1988). La possibilità di isolarlo in colture cellulari e in topi rende *N. caninum* un parassita che soddisfa i postulati di Koch (Dubey e Lindsay, 1996).

Nel 1988 sono state ipotizzate alcune caratteristiche di *N. caninum*: l'infezione per via congenita, la riattivazione dell'infezione subclinica e la trasmissione durante il periodo neonatale (Dubey et al., 1988). Grazie all'isolamento dell'antigene, fornito da questa ricerca, è stato possibile sviluppare studi immunologici e immunoistochimici: nel 1988 è stata sviluppata una diagnosi sierologica di neosporosi basata su un test indiretto che sfrutta l'utilizzo di anticorpi immunofluorescenti che ricercano l'antigene (Dubey et al., 1988; Dubey e Lindsay 1996). Nello stesso anno è stato sviluppato anche un test immunoistochimico basato su un metodo di colorazione con immunoperossidasi per rilevare *N. caninum* nei tessuti, ad esempio sezioni di tessuto fissate in formalina e incluse in paraffina (Lindsay e Dubey, 1989).

Questi strumenti sono stati fondamentali per approfondire le conoscenze su *N. caninum*. In pochi anni è emerso che la neosporosi colpisce diversi animali. Grazie alle sue caratteristiche strutturali e immunologiche, nel 1989 è stato possibile identificare *N. caninum* come causa di

aborto nei bovini da latte (Thilsted e Dubey, 1989), negli ovini (Dubey e Lindsay, 1990) e nei caprini (Barr et al., 1992).

Nel 1998 i cani domestici sono stati riconosciuti come ospite definitivo di *N. caninum* (McAllister et al., 1998). L'anno successivo è arrivata la conferma che i cani sono escretori di oocisti di *N. caninum* e che il periodo di prepatenza è di circa 5 giorni (Lindsay et al., 1999).

Più *N. caninum* viene studiato e più diventa evidente che è una causa di aborto e mortalità neonatale nei bovini di tutto il mondo (Lindsay e Dubey, 2020) e non solo.

Alcuni studi sull'attuale situazione globale sostengono che la neosporosi ovina, definita come malattia emergente in tutto il mondo, potrebbe essere più diffusa di ciò che si pensa e che dovrebbe essere considerato come agente di aborto in ovini durante la valutazione anamnestica di un caso (diagnosi differenziale) (Benavides et al., 2022).

La ricerca eziologica nei casi di aborto ovino è sempre stata superficiale poiché si è sempre basata sull'esame istopatologico dei tessuti fetali abortiti. Tuttavia, la tecnica istopatologica non permette di distinguere se le lesioni siano state causate da *T. gondii* o da *N. caninum*. Questo è il motivo per cui molti studi condotti finora potrebbero non riflettere adeguatamente l'attuale situazione della neosporosi ovina (González-Warleta et al., 2014).

Negli ultimi decenni, grazie anche alla messa a punto di nuove tecniche diagnostiche sempre più sensibili e specifiche, è aumentato il riscontro di *N. caninum* in casi di aborto e inefficienza riproduttiva anche in ambito ovino (González-Warleta et al., 2014).

A quarant'anni dalla sua scoperta, appare quindi evidente che alcuni aspetti del ciclo biologico di *N. caninum* e della sua prevalenza sono ancora sconosciuti.

## 1.2 Tassonomia

**Regno:** *Protista*

**Phylum:** *Apicomplexa*

**Classe:** *Sporozoa*

**Sottoclasse:** *Eucoccidiorida*

**Subordine:** *Eimeriorina*

**Famiglia:** *Sarcocystiidae*

**Genere:** *Neospora*

**Specie:** *Caninum*

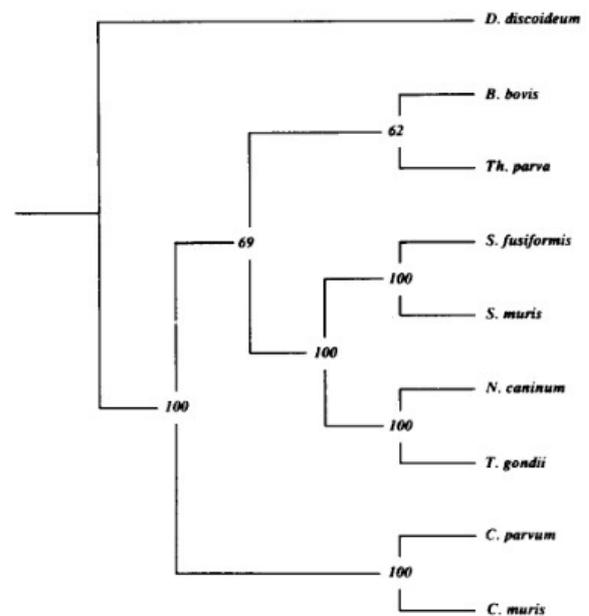


Figura 2. Filogenesi di *N. caninum*  
(fonte: Holmdahl et al., 1994).

*Neospora caninum* (Phylum *Apicomplexa*) è un parassita unicellulare endocellulare obbligato degli animali da reddito e da compagnia. Deve il suo nome scientifico alla somiglianza morfologica e patogenetica con altri sporozoi (neo = nuovo; spora = sporozoo). È morfologicamente, biologicamente e antigenicamente affine a *T. gondii*.

Oocisti di *N. caninum* sono state trovate nelle feci dei cani (Dubey et al., 1988), il che dimostra la natura coccidica di questo parassita. Questa e altre ricerche hanno portato gli scienziati a riconoscere i canidi, come i cani, i coyote e le volpi, come ospiti definitivi di *N. caninum* (Klein et al., 2019).

*N. caninum* è stato recentemente introdotto nell'ordine *Eucoccidiorida* e appartiene alla famiglia *Sarcocystidae*, così come *Toxoplasma*, *Hammondia*, *Sarcocystis*, *Besnoitia*. È stato possibile definire la sua appartenenza filogenetica alla famiglia *Sarcocystidae* solo grazie al sequenziamento dell'RNA ribosomiale (Innes et al. 2000). Questi studi hanno mostrato inoltre che esiste una percentuale alta delle sequenze nucleotidiche ribosomiali di *N. caninum* sono identiche alle omologhe di *T. gondii*. Ciò indicherebbe che questi due organismi si sono discostati solo di recente (Innes et al., 2000).

Il genere di appartenenza *Neospora* è stato dimostrato essere distinto da quello di *Toxoplasma*, con cui è stato spesso confuso, grazie al confronto, previo uso della RAPD-PCR (*random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction*), della regione ITS1 (*intertranscribed spacer region 1*) che risultava diversa nei due parassiti (Innes et al., 2000).

Il genere *Neospora* comprende due specie: *N. caninum*, considerata la specie affine, che può infettare diversi mammiferi, e *N. hughesi*, recentemente isolata, che infetta solo i cavalli (Marsh et al., 1999).

*N. hughesi* si differenzia da *N. caninum* dal punto di vista ultrastrutturale, antigenico e molecolare. Dal punto di vista antigenico, le differenze risiedono a livello di due antigeni immunodominanti nella forma di tachizoita (Marsh et al., 1999), dal punto di vista ultrastrutturale e molecolare ad alcune variazioni delle subunità ribosomiali, nonché in diversità negli antigeni di superficie SAG1 e SRS2, nelle proteine a granuli densi GRA6 e GRA7 e nella sequenza genetica ITS1 (Buxton et al., 2002).

La specie "*Neospora caninum*" ha mostrato eterogeneità intraspecifica per quanto riguarda molte caratteristiche come il profilo antigenico, la capacità di crescita *in vitro*, le manifestazioni cliniche e istopatologiche. Esiste tuttavia una certa variabilità genetica e fenotipica nei diversi isolati e in particolar modo nella virulenza e nella patogenicità (Chryssafidis et al., 2014). Gli isolati scoperti sin ora sono stati classificati in base ai danni provocati a livello fetale in:

- Ceppi a bassa virulenza: hanno scarsa capacità di provocare danni
- Ceppi a moderata virulenza (ad esempio: Nc-1)
- Ceppi ad alta virulenza (ad esempio Nc-Spain7 o Nc-Liv): causano morte fetale

### 1.3 Struttura e caratteristiche morfologiche

Il genere *Neospora*, esattamente come *T. gondii*, presenta tre diversi stadi biologici infettanti: tachizoita, cisti tissutale (contenente i bradizoiti) e oocisti.

#### Tachizoita

I tachizoiti sono la forma invasiva presente sia nell'ospite intermedio sia in quello definitivo e non hanno specificità cellulare. Hanno forma "di luna" che misura circa 6 x 2  $\mu\text{m}$  (Lindsay et al., 2020). Hanno un elevato potenziale riproduttivo e infatti penetrano la cellula ospite utilizzando sistemi di invasione attiva e diventando intracellulari. In ambiente intracellulare i tachizoiti sono situati all'interno di un vacuolo parassitoforo.

Se i tachizoiti ricevono determinati segnali dall'ospite passano, durante l'endoduogenia, allo stadio successivo di bradizoiti e formano una cisti tissutale (Lindsay e Dubey, 2020).

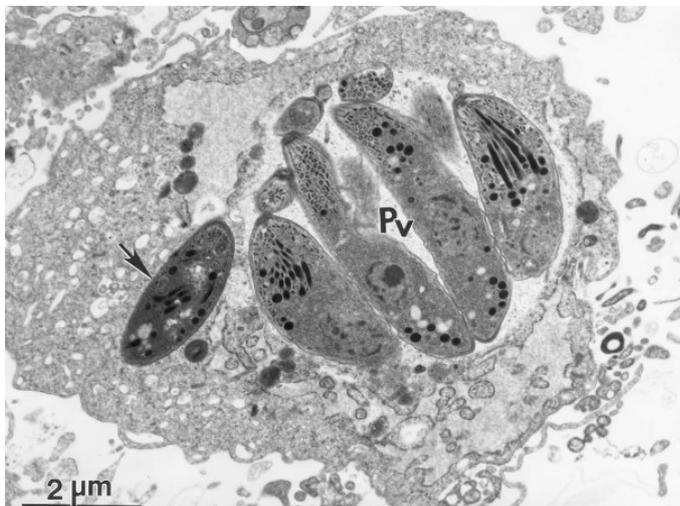


Figura 3. Immagine al microscopio elettronico di tachizoiti di *N. caninum* in colture cellulari a 2 giorni dall'inoculazione. "Pv": vacuolo parassitoforo contenente numerosi tachizoiti; la freccia a sinistra indica un tachizoita apparentemente non incluso in un vacuolo parassitoforo (fonte: Dubey et al., 2002).

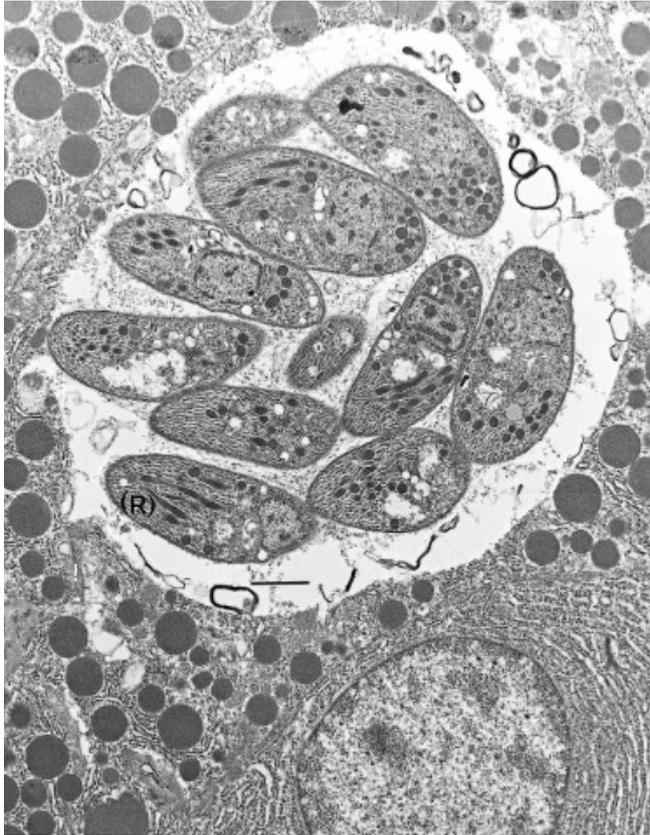


Figura 4. Tachizoiti di *N. caninum* in acini pancreatici di un topo infettato artificialmente con l'omogenato del cervello di un ovino infetto. Visibili cluster di tachizoiti nel citoplasma di una cellula ospite. "R": Roptries elettrondensi (fonte: Rodrigo e Machado, 2016).

## Cisti tissutale

La cisti tissutale è lo stadio latente di *N. caninum* e si ritrova in entrambi gli ospiti, definitivo e intermedio (Lindsay e Dubey, 2020). La cisti tissutale ha forma ovale o rotondeggiante, con una lunghezza di circa 100  $\mu\text{m}$  e una parete spessa e liscia, di circa 4  $\mu\text{m}$ . Le cisti tissutali vengono ritrovate quasi esclusivamente nei tessuti nervosi (Lindsay et al., 2020) come cervello, nervi, midollo spinale e retina (Dubey et al., 1988).

Le cisti tissutali contengono sottili bradizoiti (7 - 8 x 2  $\mu\text{m}$ ), che sono simili ai tachizoiti per dimensione e struttura. I bradizoiti, di forma allungata, si trovano però all'interno della cisti tissutale, a differenza dei tachizoiti, che si trovano liberi nel circolo ematico.

Le cisti tissutali e i bradizoiti sono formazioni "resistenti": resistono a soluzioni clorido-peptiche, proprietà che permette loro di resistere alla digestione, e resistono alle basse temperature (mantengono la vitalità e il potere infettante anche dopo 14 giorni a 4°C).

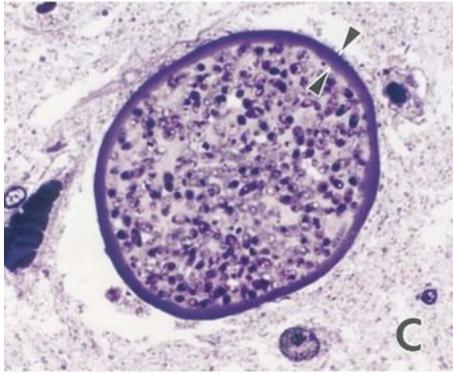


Figura 5. Cisti tissutale di *N. caninum* nel tessuto nervoso di cane, la cui parete è indicata da due frecce (fonte: Dubey et al.,1988).

## Oocisti

Le oocisti rappresentano lo stadio infettante per l'ospite intermedio. Hanno forma rotondeggiante e piccole dimensioni (tra i 10 e i 12  $\mu\text{m}$  di diametro) (Lindsay et al., 2020). Sono morfologicamente indistinguibili dalle oocisti di *T. gondii* e di *H. hammondi*; pertanto, la diagnosi non si basa sulla differenza morfologica delle oocisti ma sulla differenza genetica antigenica del tachizoita. Le oocisti vengono escrete non sporulate nelle feci dell'ospite definitivo.

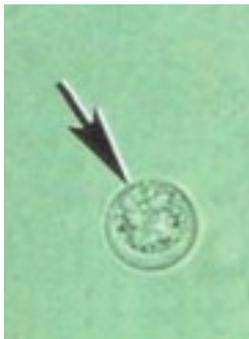


Figura 6. Oocisti di *N. caninum* non sporulata con una massa centrale indivisa, isolata da feci di cane (fonte: Dubey et al., 2007).

## 1.4 Ciclo biologico

Il ciclo completo di *N. caninum* è stato descritto definitivamente solo nel 1998, ben 10 anni dopo la sua effettiva scoperta (Figura 7). Gli scienziati dimostrarono che cani infettati sperimentalmente con *N. caninum* diventavano escretori fecali di oocisti. Per questo motivo il cane è stato riconosciuto come ospite definitivo dei *N. caninum* (McAllister et al., 1998).

*N. caninum* necessita di due ospiti per completare il suo ciclo: uno intermedio, in cui si sviluppano le forme infettanti e in cui avviene la riproduzione asessuata, e uno definitivo, in cui raggiunge lo stadio adulto e si riproduce per via sessuata. La prima fase del ciclo, che vede come protagoniste le oocisti, si svolge in ambiente esterno.

L'ospite intermedio di *N. caninum* per eccellenza è il bovino, quello definitivo è il cane. In entrambi gli ospiti *N. caninum* può dare manifestazioni cliniche, diverse in base al tipo di ospite.

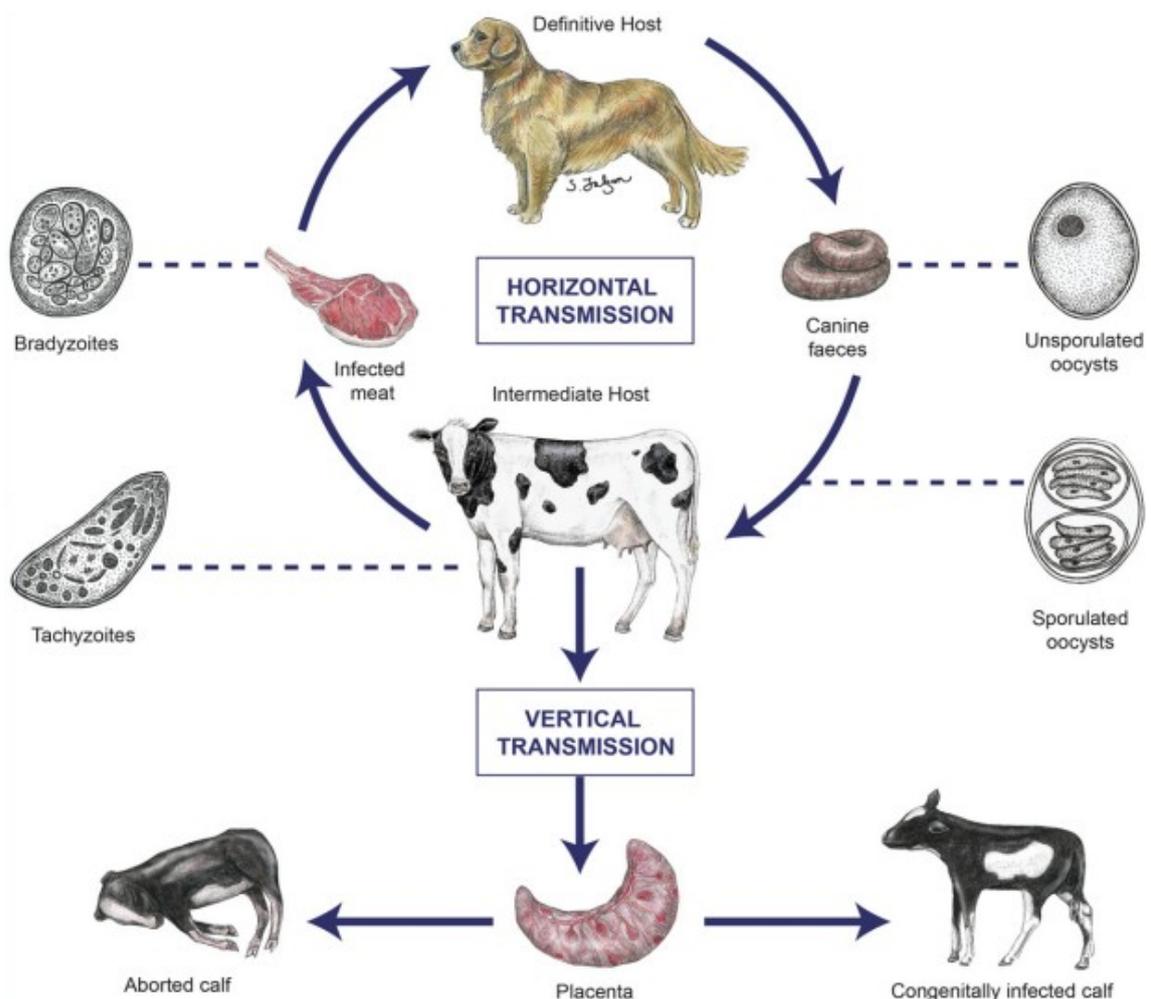


Figura 7. Ciclo biologico di *N. caninum* (fonte: Goodswen et al., 2013).

## **Ambiente esterno**

Come dimostrato dallo studio di McAllister, i cani sperimentalmente infettati sono in grado di emettere oocisti non sporulate da 8 a 23 giorni dopo l'infezione. L'escrezione ha una durata mediamente inferiore alle 2 settimane e i cuccioli sono escretori con una frequenza maggiore rispetto agli adulti (McAllister, 2016). Le oocisti emesse diventano infettanti in ambiente in seguito alla sporogonia, un processo riproduttivo asessuato in cui la cellula madre si divide per meiosi. Il processo sporogonico porta alla formazione 2 sporocisti tetrazoiche, ovvero sporocisti contenenti 4 sporozoitii ciascuna. Le oocisti sporulano e diventano infettanti in ambiente esterno in 24-72 ore o a volte fino a 5 giorni, in base alla temperatura esterna e ad altri parametri ambientali come il tasso di umidità ad esempio. In questa fase le oocisti sono infettanti per gli ospiti intermedi e possono restare vitali e infettanti per molti mesi (Dubey et al., 2004).

## **Ospite intermedio**

Gli ospiti intermedi di *N. caninum* sono numerosi: bovini, equini, ovini, caprini, bufalini, canidi e camelidi. Recentemente è stato riconosciuto come ospite intermedio naturale anche il cervo dalla coda bianca, che svolge un ruolo importante nel ciclo selvatico di *N. caninum* (Rosypal et al., 2005). Così come il cervo dalla coda bianca e il coyote, altri ruminanti e canidi selvatici, variabili in base al continente, potrebbero contribuire ad alimentare il ciclo selvatico che alimenta a sua volta quello domestico (Rosypal e Lindsay, 2005).

Nell'ospite intermedio, *N. caninum* passa dallo stadio di oocisti allo stadio di cisti tissutale. Instaurato quest'ultimo stadio, l'ospite intermedio diventa permanentemente infetto.

Esistono due vie principali, complementari tra loro, tramite le quali l'ospite intermedio contrae l'infezione (Figura 8): la via orizzontale e la via verticale.

La via verticale è distinta in due tipi: esogena ed endogena (Figura 9) (Trees e Williams, 2005).

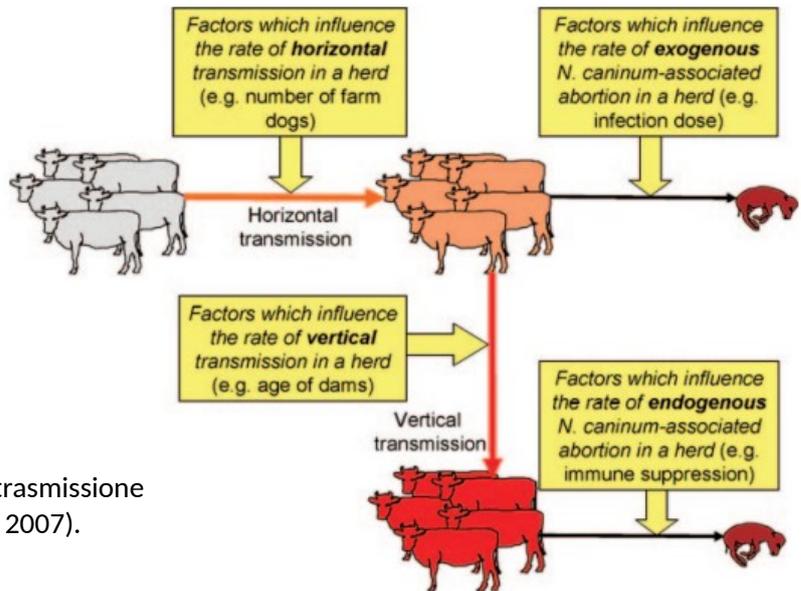


Figura 8. Trasmissione orizzontale e trasmissione verticale di *N. caninum* (Dubey et al., 2007).

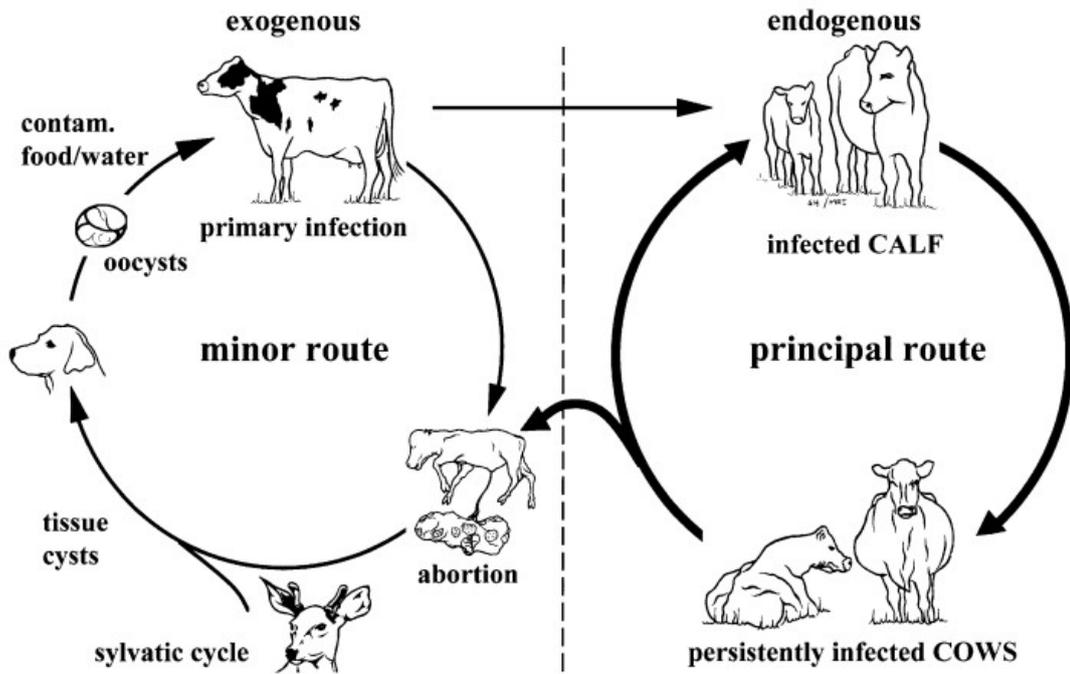


Figura 9. Trasmissione della neosporosi bovina. A sinistra: via orizzontale o esogena, via minoritaria; a destra: via verticale o endogena o transplacentare, via principale (fonte: Dubey et al., 2006).

La via orizzontale prevede l'ingestione di alimenti, ad esempio placente infette o feti abortiti infetti, o acqua contaminati da oocisti sporulate. Il ciclo viene quindi definito oro-fecale.

Durante l'infezione per via orizzontale le oocisti sporulate passano attraverso il lume intestinale e colonizzano l'intero organismo usando la via linfoematogena. A questo punto inizia la divisione endoduogenica, che porta alla formazione di pseudocisti intracellulari, ciascuna delle quali può contenere fino a un centinaio di tachizoiti (Lindsay et al., 2020). Quando la pseudocisti si rompe provoca anche la rottura della cellula in cui è contenuta e i tachizoiti, che si ritrovano liberi nello spazio intercellulare, possono invadere altre cellule e dare luogo alla divisione endoduogenica.

**La via verticale** consiste nella trasmissione transplacentare di tachizoiti al feto durante la gravidanza. Quest'ultima via è considerata la più frequente delle due e ha una probabilità di successo di infezione anche del 95% (ovvero una bovina infetta infetterà il feto con una probabilità del 95%) (Taylor et al., 2017). Tuttavia, non necessariamente la manifestazione abortigena segue l'infezione: il neonato può anche nascere clinicamente sano ma essere infetto oppure può non essere infetto.

La trasmissione per via transplacentare è stata osservata in numerose specie: bovini, ovini, caprini, cani e gatti. L'infezione per via verticale può essere il risultato di una infezione *ex novo* contratta durante il la gravidanza e trasmessa direttamente al feto tramite la placenta, e in questo caso si parla di **infezione transplacentare esogena**, oppure può essere causata dalla riattivazione di tachizoiti contenuti nelle cisti tissutali, ovvero di **trasmissione transplacentare endogena** (la bovina è infetta in modo latente ancor prima della fecondazione). Quest'ultimo fenomeno di riattivazione del parassita che causa nuova infezione viene chiamato recrudescenza (Trees e Williams, 2005). La distinzione tra le due vie di trasmissione transplacentare è importante in quanto sembra che la trasmissione endogena predisponga maggiormente a situazioni di aborto ripetuto o di trasmissione congenita nei vitelli nati vivi (McAllister, 2016). Se una bovina sieropositiva non manifesta aborto al primo parto difficilmente lo manifesterà in seguito; al contrario, una bovina sieropositiva che ha già manifestato aborto presenterà un maggior rischio di manifestarlo nuovamente (Dijkstra et al., 2003).

Tuttavia, l'esito di un'infezione da *N. caninum* non ha sempre esito scontato. Una bovina infettata durante la gravidanza può infatti abortire, partorire un neonato clinicamente malato e infetto, partorire un neonato clinicamente sano ma infetto o partorire un neonato non infetto.

Non necessariamente quindi da una bovina infetta nascerà un vitello infetto. La probabilità di trasmettere l'infezione per via transplacentare dipende anche dal sistema immunitario sia della madre sia del feto.

Nonostante *N. caninum* sia stato trovato nel seme di toro congelato, la trasmissione tramite seme non sembra essere rilevante (Ortega-Mora et al., 2003). La trasmissione venerea non è mai stata dimostrata (Osoro et al., 2009). Nonostante ciò, l'embriotransfer sembra essere un buon metodo di controllo per prevenire l'infezione per via verticale tramite seme (Baillargeon et al., 2001). Anche la trasmissione tramite latte materno, come quella del seme, non sembra essere una via efficace. Infine, la trasmissione diretta tra bovini non è mai stata dimostrata.

### **Ospite definitivo**

I principali ospiti definitivi di *N. caninum* sono i canidi. Sono considerati ospiti definitivi anche il coite e il lupo, che contribuiscono ad alimentare il ciclo selvatico di *N. caninum* tramite l'escrezione fecale di oocisti (Lindsay e Dubey, 2020). Il cane, accogliendo anche il ciclo extraintestinale, può in realtà comportarsi anche da ospite intermedio diventando così un ospite completo.

L'ospite definitivo si infetta solitamente per via orizzontale ingerendo feti abortiti o placenti e involucri fetali contenenti pseudocisti o cisti tissutali. Una volta ingerite, le pseudocisti e le cisti tissutali liberano bradizoiti, che convertono a tachizoiti e all'interno dell'intestino invadono le cellule intestinali e attuano una riproduzione asessuata detta schizogonia, ovvero un processo in cui la cellula madre si divide ripetutamente per mitosi in numerose cellule figlie. Dal ciclo schizogonico originano i merozoiti, i quali possono intraprendere un altro ciclo schizogonico oppure trasformarsi in organismi sessuati, che daranno luogo alla gametogonia, un processo riproduttivo sessuato in cui le cellule differenziano dando luogo ai gameti che successivamente si fondono. La gametogonia porta alla formazione di oocisti, le quali vengono espulse non sporulate nell'ambiente esterno tramite le feci. Dopo un determinato periodo in ambiente esterno di circa 1-5 giorni esse sporulano diventando infettanti per l'ospite intermedio e il ciclo ricomincia. Anche nel cane, come nell'ospite intermedio, è presente la via di trasmissione endogena transplacentare che comporta la nascita di cuccioli potenzialmente infetti (Dubey et al., 2004).

## 1.5 Epidemiologia

*N. caninum* è un parassita ubiquitario rilevato in tutto il mondo. Le sue segnalazioni provengono principalmente da allevamenti bovini dove riveste il ruolo di agente abortigeno, causando gravi perdite economiche e problemi sanitari.

Negli ultimi 20 anni il suo ruolo di agente abortigeno è diventato sempre più evidente anche negli allevamenti ovini e caprini: sono stati riportati casi di segnalazioni da oltre 27 Paesi tra Africa, America, Asia, Europa, Oceania (Benavides et al., 2022).

La prevalenza dell'aborto associato a *N. caninum* è diversa in tutto il mondo e può presentarsi con diversi pattern: sporadico, endemico o epidemico. Il pattern sporadico avviene occasionalmente in un allevamento. Il pattern endemico invece è caratterizzato da un'infezione cronica di un allevamento in cui il parassita infetta linee familiari per via transplacentare in seguito a recrudescenza (Goodswen et al., 2013). Il pattern epidemico in particolare è attribuito alla a un'infezione primaria di un bacino naïve esposto a un'unica sorgente di infezione che infetta contemporaneamente più soggetti (Goodswen et al., 2013).

### Prevalenza

L'analisi sierologica è il metodo di elezione per lo studio epidemiologico di *N. caninum*. La sieroprevalenza individuale di *N. caninum* è molto variabile sia tra Paesi diversi, sia tra regioni diverse dello stesso Paese. L'utilizzo di diversi tipi di test sierologici disponibili e il diverso livello di *cut off* considerato sono altri fattori che incrementano la variabilità della prevalenza di *N. caninum* (Dubey et al., 2017). Questa condizione di estrema variabilità è presente sia in ambito bovino, dove i valori di prevalenza sierologica vanno dal 12 al 42% (Dubey et al., 2017), sia in ambito ovino, dove la variabilità va dall' 0% al 67,4% (Benavides et al., 2022). Gli animali destinati alla produzione di latte sono spesso più colpiti.

*N. caninum* può quindi essere presente in allevamento in modo sporadico (tasso di aborto: <3%), o preoccupante (tasso di aborto: 5-10%). Nei rari casi in cui il tasso di aborto supera il 30% (tempesta di aborti) è ragionevole presumere che l'infezione sia entrata in azienda per via orizzontale, improvvisamente (Goodswen et al., 2013).

Il primo caso di neosporosi nella bovina da latte in Italia è stato segnalato nel 1997. Le zone interessate da problemi riproduttivi e a carattere enzootico erano l'Italia Settentrionale e quella

Centrale. Ulteriori studi hanno riportato una sieroprevalenza di *N. caninum* nelle bovine da latte dell'87% nel Sud Italia (Piergili Fioretti et al., 2020).

La neosporosi, sia bovina sia ovina, è una malattia emergente diffusa in tutto il mondo. Recentemente sono stati svolti diversi studi epidemiologici per capirne la reale prevalenza (Benavides et al., 2022).

Uno studio del 2022 riporta una prevalenza a livello globale di *N. caninum* in feti abortiti (studiata mediante indagini molecolari) del 15% nelle pecore e del 7% nelle capre. Contestualmente, la prevalenza globale di *N. caninum* tramite sierologia nei feti abortiti di pecora è stata stimata attorno al 17%. La prevalenza globale di pecore infette da *N. caninum* che hanno già avuto un aborto è stata stimata invece attorno al 3% (Nayeri et al., 2022).

Un altro studio del 2022, che valuta la sieroprevalenza globale di *N. caninum* confrontando i dati di 7 banche dati a livello mondiale (Nord America, Centro America, Sud America, Asia, Africa, Europa, Oceania), descrive valori di sieroprevalenza di *N. caninum* nelle pecore del 13% (Mendoza-Morales et al., 2022).

Da questo studio emerge inoltre che, tra i Paesi analizzati, quelli con sieroprevalenza più alta (oltre il 40%) sono: Gabon e Senegal (Africa, rispettivamente: 42.10% e 41.95%), Colombia e Brasile (Sud America, rispettivamente 78.57% e 60.55%), Italia (Europa, 44.41%) (Mendoza-Morales et al, 2022). L'Italia sembra quindi essere tra i Paesi più colpiti da neosporosi in ambito ovino.

Il confronto tra gli isolati di diversi paesi, tra cui USA, Giappone e Svezia, ha evidenziato differenze genetiche, individuando genotipi distinti, a testimoniare l'eterogeneità genetica di *N. caninum* (Schock et al., 2001; Innes et al., 2000). I genotipi più diffusi sono 5 e sono: NC-1, BPA-1, NC-Liverpool, NC-SweB1, JPA-2, isolati in diversi Paesi come Regno Unito (NC-Liv), USA (quattro nel cane: NC-1 a 3 e NC-Liv; cinque nel bovino: BPA-1 a 5), Svezia (NC-SweB1), Giappone (JPA-2) (Holdmahl et al., 1997). In Giappone sono stati individuati 7 cluster, di cui soltanto uno è unico e diverso rispetto ai cluster americani ed europei (El-Alfy et al., 2021).

Alcune ricerche svolte con la tecnica RAPD-PCR, che è in grado di rivelare polimorfismo del DNA anche quando la differenza genetica è minima, hanno comparato gli isolati di *N. caninum* provenienti da USA, Europa e Giappone. È emerso che gli isolati prelevati da bovini e cani dello stesso continente sono molto simili ed esistono delle piccole differenze genetiche tra isolati di continenti diversi. È stato inoltre osservato che i diversi isolati differiscono anche per la loro patogenicità *in vivo*: l'isolato americano NC-Liverpool ha indotto segni clinici più gravi nei topi

rispetto all'isolato svedese NC-SweB1 (Innes et al., 2000). Gli isolati non hanno mostrato alcuna appartenenza a un cluster né per l'ospite né per l'origine geografica (Schock et al., 2001). Maggiori ricerche riguardo i genotipi di *N. caninum* e la loro distribuzione geografica potrebbero aiutare a meglio definire la conoscenza dell'epidemiologia di questo parassita.

In Italia, esistono delle sottopopolazioni di *N. caninum* diverse da quelle circolanti in Europa, distribuite in modo indipendente dalla localizzazione geografica (Schock et al., 2001) (Regidor-Cerrillo et al., 2020). Secondo una ricerca condotta tramite MLGs (multilocus microsatellite genotyping) il locus MS7 ha evidenziato nella popolazione italiana un alto grado di polimorfismo mostrando 10 varianti alleliche diverse (AT-AA-(TA)<sub>x</sub>-GG 8.1, 9.1, 10, 10.1, 12, 13, 14, 15, 17, 18) in soli 31 campioni analizzati.

Poco è noto sulla caratterizzazione genetica di *N. caninum* negli ovini. Ad oggi sono stati isolati in coltura cellulare solamente tre isolati: il primo dal cervello di una pecora giapponese in gestazione, che non è stato tuttavia identificato geneticamente (Koyama et al., 2001), e altri due in due agnelli spagnoli clinicamente sani ma congenitamente infetti, i primi identificati anche geneticamente come genotipi NC-Spain11 e NC-Spain12 (García-Sánchez et al., 2020). La genotipizzazione dei due isolati spagnoli, condotta sulla base di 9 microsatelliti, ha mostrato un genotipo multilocus identico (MLG). Il confronto tra i due isolati spagnoli e alcuni genotipi bovini provenienti da diversi paesi tra cui Argentina, Spagna, Messico, Germania, Scozia, come anche il confronto con il genotipo ovino giapponese, ha mostrato che gli MLG di Nc-Spain11 e Nc-Spain12 sono unici e differiscono dagli altri MLG (García-Sánchez et al., 2020). Le analisi di eBrust inoltre hanno trovato una relazione genetica tra gli MLG degli isolati ovini spagnoli e di quelli bovini, che è risultata essere più stretta con i bovini spagnoli provenienti dalla stessa area geografica di NC-Spain11 e NC-Spain12 (García-Sánchez et al., 2020). Altri dati riguardanti isolati specifici italiani non sono ad oggi disponibili.

La Tabella 1 riporta i valori di sieroprevalenza di *N. caninum* negli ovicapri a livello europeo (Basso et al., 2022).

Tabella 1: prevalenza degli anticorpi contro *N. caninum* in pecore d'Europa

Country	Region	Test (source)	n positive animals/ n examined animals	% positive	n farms with positive animals/ n sampled farms	% positive	Observations
Czech Republic	Central Bohemia Ústí nad Labem	ELISA (cELISA Neospora caninum Antibody Test Kit, VMRD, USA)	63/547	12.0	9/9	100	Healthy adult sheep.
Greece	Various regions	ELISA (in house)	77/458	16.8	28/50	56.0	Healthy dairy ewes (age 2–4 years), semi-extensive grazing, with grain and forages supplementation
Italy	Lombardy: Bergamo, Milan, and Varese provinces Orobic Alps, Bergamo province	ELISA (in house) + immunoblot as confirmatory test ELISA (CHEKIT Neospora, Bommeli Diagnostics, Switzerland)	83/428 22/1010	19.3 2.2	ns ns	89.4 ns	Randomly sampled general sheep population, different rearing systems (semi-extensive, transhumant)
Poland	Mazurian lake district	ELISA (cELISA Neospora caninum Antibody Test Kit, VMRD, USA) + immunoblot as confirmatory test	8/64	13.0	1/1	100	Healthy Merino ewes (age 1–2 years) from a mixed flock with goats and fallow deer, semi-extensive management
Slovakia	Kosice, Presov	ELISA (Neospora caninum indirect ELISA ID. vet, France) + verification of positive and doubtful sera by cELISA (cELISA Neospora caninum Antibody Test Kit, VMRD, USA).	14/382	3.7	ns/100	ns	Dairy ewes, which had aborted
Spain	Castilla y León: Zamora province  Extremadura: Badajoz, and Andalusia: Córdoba and Jaén Castilla-La Mancha: Ciudad Real province Galicia	ELISA (NeSALUVET ELISA, Spain) ELISA (ID Screen Neospora caninum Indirect Multispecies, ID.vet, France) ELISA (cELISA Neospora caninum Antibody Test Kit, VMRD, USA) ELISA (ID Screen Neospora caninum Indirect Multi-species, ID.vet, France)	304/986 4/209 7/180 132/2400	30.8 1.9 3.9 5.5	1/1 3/12 ns/17 32/44	100 25.0 ns 72.7	Dairy Assaf breed ewes with history of abortion in the flock, semi-intensive management, balanced ration (concentrate and forage) feeding. <i>N. caninum</i> seropositive dams were more likely to abort and to have repeated abortions than seronegative ones. <i>N. caninum</i> DNA was isolated from aborted fetuses. Culled Merino and crossbred ewes with no particular disease, extensive breeding systems Manchega sheep flocks, male and female sheep
	Galicia: Lugo Province	ELISA (cELISA Neospora caninum Antibody Test Kit, VMRD, USA)	18/177	10.1	ns	ns	Meat crossbred ewes, semi-extensive breeding system, grazing with hay or silage supplement
Switzerland	Country-wide  Zurich	ELISA (ID Screen® Neospora caninum Indirect, ID.vet, France) + immunoblot (in house) of inconclusive sera IFAT (in house, cut-off 1:160)	5/653 12/117	0.8 10.3	4/143 1/1	2.8 100	Randomly sampled general sheep population, healthy animals, different sex and ages Ewes from a flock with abortion problems. <i>N. caninum</i> DNA detected in aborted fetuses
United Kingdom	England and Wales	ELISA (Mastazyme, Mast Diagnostics) + verification of positive sera by IFAT (in house, cut-off 1:50)	3/660	0.45	ns	ns	Ewes, which had recently aborted, sent by veterinary practitioners

Tabella 2: prevalenza degli anticorpi contro *N. caninum* in capre d'Europa

Czech Republic	Karlovy Vary, Usti Labem, Central Bohemia, Liberec, Prague, Hradec Kralove, Plzen, and Pardubice	ELISA (cELISA Neospora caninum Antibody Test Kit, VMRD, USA) + IFAT (VMRD, USA, cut-off 1:40) as confirmatory test	15/251	6.0	ns/15		healthy adult goats (age $\geq$ 12 months)
Greece	Various regions	ELISA (in house)	26/375	6.9	28/50	56	Healthy adult dairy female goats, semi-extensive grazing, with grain and forages supplementation
Italy	Lombardy: Bergamo, Milan, and Varese provinces	ELISA (in house) + immunoblot as confirmatory test	24/414	5.7	ns	32.1	Randomly sampled goat population, different rearing systems (intensive, semi-extensive, transhumant)
Poland	Mazurian lake district  Country-wide	ELISA (cELISA Neospora caninum Antibody Test Kit, VMRD, USA) + immunoblot as confirmatory test ELISA (CHEKIT Neospora caninum Antibody ELISA, IDEXX) + IFAT (VMRD, USA, cut-off 1:160) as confirmatory test	8/39 5/1060	21.0 9.0	1/1 4/49	100 0.8	Healthy adult Polish Fawn Improved female goats (age 1–2 years) from a mixed flock with sheep and fallow deer, semi-extensive management Adult dairy female goats ( $\geq$ 12 months)
Romania	Crişana, Maramures, Transylvania and Muntenia	ELISA (Chekit Neospora caninum Antibody ELISA; IDEXX-Bommeli, Switzerland)	12/512	2.3	ns	ns	dairy female goats (kids and adult goats), backyard and semi-extensive management, grazing and supplemented with fodder and concentrates
Slovakia	Eastern region	ELISA (cELISA Neospora caninum Antibody Test Kit, VMRD, USA)	18/116 (a) 6/41 (b)	15.5 (a) 14.6 (b)	1/1	100	(a) adult dairy White Shothaired female and male goats (age 1–4 years) from farm with history of frequent abortions, semi-extensive management. (b) kids (< 6 months). <i>N. caninum</i> DNA was detected in blood from 14/18 <i>Neospora</i> -seropositive animals
Spain	Galicia	ELISA (cELISA Neospora caninum Antibody Test Kit, VMRD, USA)	45/638	6.0	19/50	38.0	Male and female Cabra Galega and crossbred goats, different ages, extensive and semi-extensive husbandry system
Switzerland	Country-wide	ELISA (ID Screen® Neospora caninum Indirect (ID.vet, France) + immunoblot (in house) of inconclusive sera	7/748	0.9	3/164	1.8	Randomly sampled general goat population, healthy animals, different sex and ages

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay; cELISA: competitive ELISA; IFAT: indirect fluorescent antibody test; ns: not specified.

## Fattori di rischio

I fattori di rischio che maggiormente influenzano la diffusione della neosporosi bovina sono:

- il management aziendale (le aziende di vacche da latte sono più a rischio di quelle da carne);
- l'utilizzo della rimonta interna anziché di quella esterna,
- la presenza di cani in azienda che contribuisce alla diffusione orizzontale,
- lo stato fisiologico della bovina, lo stato gravidico, la storia dell'allevamento e l'età della bovina (le manze gravide sono esposte a un rischio maggiore di aborto)
- la presenza di placenti e feti abortiti non custoditi in azienda (Romo-Gallegos et al., 2019).

Per quanto riguarda la neosporosi ovina non sono disponibili molte informazioni sull'influenza di fattori individuali come il genere, l'età o la razza.

Numerosi studi sono stati effettuati al riguardo ma i risultati sono contrastanti: alcuni rilevano una maggiore prevalenza per alcune categorie di ovini (ad esempio negli adulti, nei maschi, nelle femmine, nella razza merino) altri non hanno individuato differenze significative tra le categorie analizzate (Benavides et al., 2022). Basso et al. (2022) hanno riportato possibili correlazioni fra sieropositività per *N. caninum* e la presenza di cani giovani (< 6 mesi) e di bovini negli allevamenti. Uno studio condotto nel Nord Italia ha dimostrato che alcuni fattori ambientali, come temperature annuali, precipitazioni e la loro associazione influenza il rischio di infezione sia di *N. caninum* sia di *T. gondii* negli ovini (Gazzonis et al., 2019).

## 1.6 Patogenesi, segni clinici e rilievi patologici

### Nell'ospite definitivo (cane)

#### *Patogenesi*

Nell'ospite definitivo *N. caninum*, presente nella forma di tachizoita, ha la capacità di invadere in modo attivo tutte le cellule dell'organismo e svilupparsi all'interno di queste. A seguito dell'invasione cellulare, i tachizoiti si localizzano nel citoplasma, all'interno di un vacuolo parassitoforo. I tachizoiti invadono le cellule già dopo 60 minuti dall'infezione. Successivamente avviene la divisione endoduogenica che comporta la formazione di una pseudocisti che provoca la rottura della cellula, e quindi scatena processi di infiammazione e necrosi.

#### *Segni clinici*

Il cane può infettarsi sia tramite la via orizzontale, con l'ingestione di tachizoiti/bradizoiti/oocisti sporulate, sia soprattutto tramite la via verticale, ovvero per via endogena transplacentare. L'infezione è più frequente nel cucciolo (3-9 settimane fino a 6 mesi) per via della maggiore incidenza della via transplacentare o congenita (Rodrigo e Machado, 2016). Il cane infetto può essere asintomatico o mostrare gravi segni clinici: la paralisi ascendente dagli arti posteriori accompagnata da atassia è il primo sintomo che si riscontra e può avere decorso fatale. Successivamente si ha degenerazione delle fibre muscolari (atrofia muscolare) e inibizione della conducibilità delle cellule nervose. Alcuni sintomi che possono insorgere sono contratture, iperestensione dell'arto coinvolto, difficoltà nella deglutizione, paresi mascellare, lesioni multifocali del SNC, atrofia muscolare generalizzata, morte improvvisa da miocardite infiammatoria (Lyon, 2010).

#### *Rilievi patologici*

Le lesioni riscontrate sono localizzate più frequentemente a livello di SNC (soprattutto la sostanza grigia a livello cerebrale e la sostanza bianca a livello midollare), di muscoli scheletrici, miocardio, fegato, rene. Spesso sono lesioni aspecifiche e a livello istologico si nota la presenza di infiammazione granulomatosa non suppurativa, infiltrazioni linfoplasmocitarie e gliosi (Buxton et al., 2002).

## **Nell'ospite intermedio (bovino)**

### *Patogenesi*

La patogenesi dell'aborto è multifattoriale e dipende da interazione del sistema immunitario materno e di quello fetale con parassita, la patogenicità del ceppo riscontrato, il momento della gravidanza in cui viene contratta l'infezione.

L'aborto, segno tipico della neosporosi, può verificarsi nelle bovine di qualsiasi età in qualsiasi momento a partire dal terzo mese di gravidanza sino alla fine della gestazione ma è più frequente tra il 5° e il 7° mese di gravidanza (Dubey et al., 2006). Questo periodo di maggiore incidenza è legato alla maturazione del sistema immunitario e infiammatorio del feto che rende instabile la relazione ospite-parassita. A seconda dello stadio gestazionale nel quale si contrae l'infezione, si ottengono esiti diversi:

- Primo periodo (0-3 mesi): riassorbimento embrionale, aborto, mummificazione, autolisi. L'infezione non viene trasmessa alla prole (McAllister 2016)
- Secondo periodo (4-7 mesi): aborto
- Terzo periodo: nascita di un vitello sano ma cronicamente infetto

Alcuni studi dimostrano che, associata alla presenza di neosporosi, vi è una risposta immunitaria sia umorale sia cellulo-mediata, che si traduce in un alto livello di IFN- $\gamma$ , anticorpi IgG2 e Th1. L'IFN- $\gamma$ , durante l'infezione primaria, attiva una risposta pro-infiammatoria in cui sono coinvolti macrofagi e cellule mononucleate. Da studi in laboratorio sembra che l'IFN- $\gamma$  inibisca la crescita dei tachizoiti e che sia proprio l'IFN- $\gamma$  a stimolare la trasformazione dei tachizoiti in cisti tissutali (Goodswen et al., 2013). Superata la fase acuta dell'infezione e formatesi le cisti tissutali, l'animale diventa cronicamente infetto. Il parassita può rimanere in forma non attiva di cisti tissutale nel bovino infetto o riattivarsi tramite la cosiddetta recrudescenza.

Nel caso di infezione orizzontale di una bovina non gravida, le conseguenze note sono: infezione latente con recrudescenza durante la gravidanza oppure nascita di vitelli sieronegativi. Ciò suggerisce un potenziale sviluppo di immunità protettiva quando l'infezione avviene per via orizzontale (Innes et al., 2001). I soggetti infettati per via verticale endogena restano persistentemente infetti e possono, a loro volta, trasmettere l'infezione alla prole (Dijkstra et al., 2003). Uno studio ha dimostrato che la risposta immunitaria di bovine

cronicamente infette era protettiva verso nuove infezioni per via orizzontale ma non per infezioni da recrudescenza (Williams et al., 2003). Tuttavia, è noto che il rischio di aborto diminuisce nelle successive gravidanze e ciò fa sospettare che anche l'animale persistentemente infetto possa sviluppare un certo grado di immunità (Dijkstra et al., 2003).

Diversamente da *T. gondii*, *N. caninum* provoca aborti ripetuti nello stesso soggetto. Questo accade perché *N. caninum* non stimola una forte immunità cellulo-mediata e perché, dopo la prima infezione, resta nell'ospite intermedio in forma latente ed è in grado, in momenti di stress dell'ospite intermedio quali la gravidanza, di riattivarsi e provocare nuovamente aborto.

Le oscillazioni della risposta immunitaria nella bovina hanno infatti un ruolo nel meccanismo di morte fetale, il quale non è ancora stato del tutto spiegato (Horcajo et al., 2016). Durante la gravidanza, nelle prime fasi, si ha infatti uno spostamento della risposta immunitaria verso la risposta tipo Th2 e un incremento nel rilascio di progesterone che inibisce l'espressione di citochine pro-infiammatorie quali IFN- $\gamma$  e IL-17 e aumenta l'espressione di IL-4 (Maeda et al., 2013). Questo stimolo permette l'attivazione dell'infezione, stimolando la risposta immunitaria dell'organismo.

Pochi sono i dati disponibili circa la casistica degli aborti da *N. caninum* negli ovini. Uno studio del 2020 ha individuato un tasso di trasmissione verticale da pecora ad agnello compreso tra il 67 e il 93% e un tasso di mortalità neonatale compreso tra il 21,4 e il 46,1% (González-Warleta et al., 2020).

Un altro studio del 2021 ha analizzato un allevamento di ovini con un tasso di aborto del 25% e con sieroprevalenza di *N. caninum* del 32%, e ha individuato due classi di ovini: quella dei sieropositivi e quella dei sieronegativi. Nei sieropositivi rispetto ai sieronegativi sono stati registrati rispettivamente un tasso di aborto del 36% contro il 9%, una tendenza ad avere aborti ripetuti, da duplici a triplici o più, maggiore nei sieropositivi con un OR = 10.13 contro un OR = 4.4 nei sieronegativi (Sánchez-Sánchez et al., 2021). L'86% degli ovini sieropositivi ha inoltre trasmesso l'infezione alla prole, questo a rafforzare l'ipotesi che la trasmissione endogena trasplacentare resta la maggiore via di trasmissione (Sánchez-Sánchez et al., 2021).

### *Segni clinici*

Il principale segno clinico di neosporosi nella bovina è l'aborto, che può essere isolato o ripetuto, più frequente tra il 5° e il 7° mese di gravidanza. A seconda del momento della gravidanza in cui insorge l'infezione il feto può avere diversi destini: se l'infezione viene

contratta nelle prime fasi della gravidanza si può avere morte in utero per riassorbimento fetale, mummificazione o autolisi; se avviene nelle fasi finali della gravidanza si può avere natimortalità, nascita di vitelli disvitali e/o sintomatici (sintomi neurologici), nascita di vitelli sani ma cronicamente infetti (Innes et al., 2002).

### *Rilievi patologici*

Le lesioni eventualmente presenti nei feti abortiti, che spesso sono autolitici o mummificati, sono aspecifiche, simili a quelle di *T. gondii*. In istologia possono essere presenti lesioni infiammatorie necrotizzanti non suppurative in cervello, cuore, fegato, muscolatura striata. Negli ovini possono essere presenti placentiti multifocali necrotizzanti, mineralizzazioni, infiammazione non suppurativa dei cotiledoni, necrosi multifocale e gliosi nel cervello del feto ma anche necrosi multifocale e miosite multifocale non purulenta (Moreno et al., 2012).

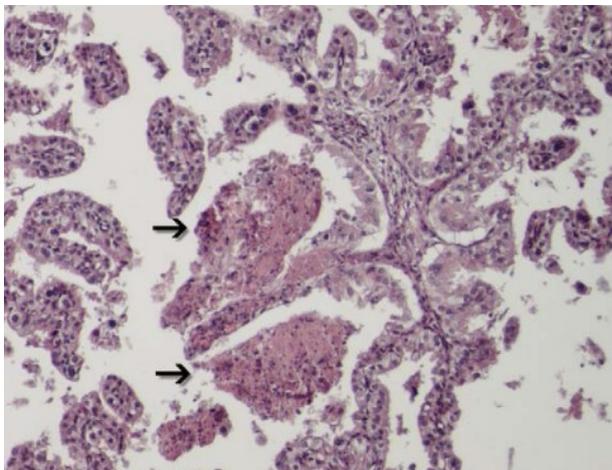


Figura 10. Necrosi focale in una placenta bovina (fonte: Buxton et al., 2002).

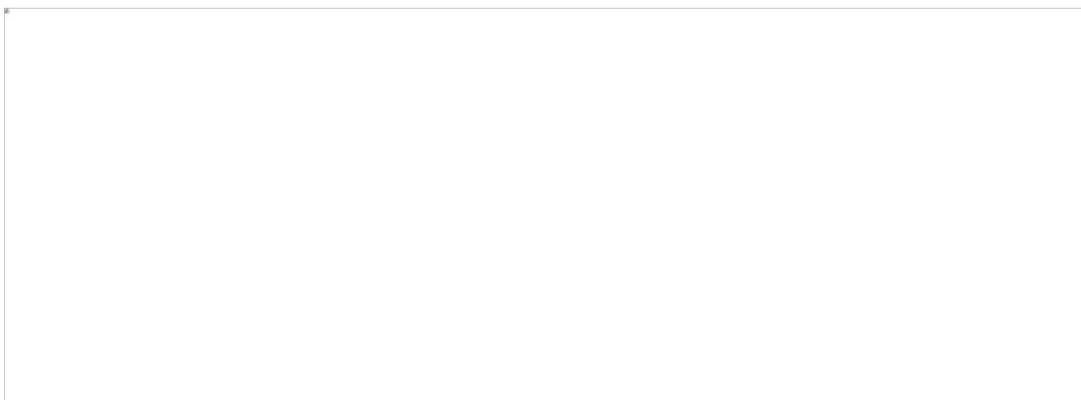


Figura 11. A sinistra: sezione istologica di encefalo bovino con necrosi focale e pattern di cellule mononucleate in periferia. A destra: sezione istologica di encefalo bovino con encefalite focale (fonte: Dubey et al., 2006).

## Vitello

Il feto subisce diversi destini a seconda del periodo gestazionale in cui viene contratta l'infezione:

- morte con riassorbimento fetale o mummificazione (fino al 3° mese);
- mortalità neonatale o nascita di un vitello infetto sintomatico (da 3 a 6 mesi);
- nascita di un vitello sano ma infetto (da 6 a 9 mesi) (la maggior parte delle bovine sieropositive partorisce un vitello sano ma infetto).

Il vitello sintomatico nasce sottopeso e presenta debolezza muscolare, arti flessi o iperestesi, atassia, diminuita percezione e diminuito riflesso patellare.

Le lesioni riscontrabili sono malacia, alterazioni del midollo allungato, miosite, degenerazione muscolare e miocardite, encefalomielite non suppurativa con manicotti perivascolari, gliosi, necrosi.

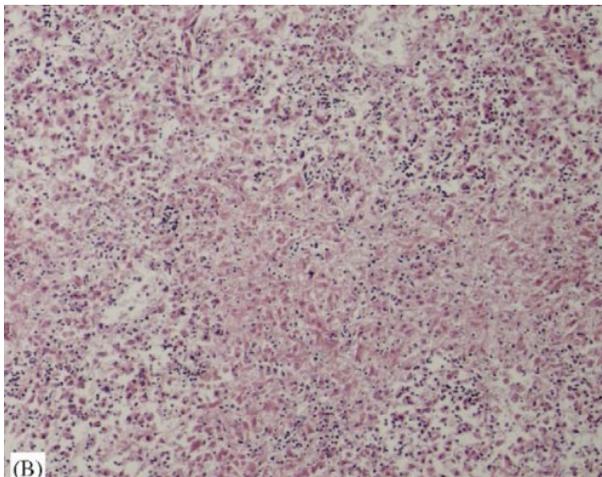
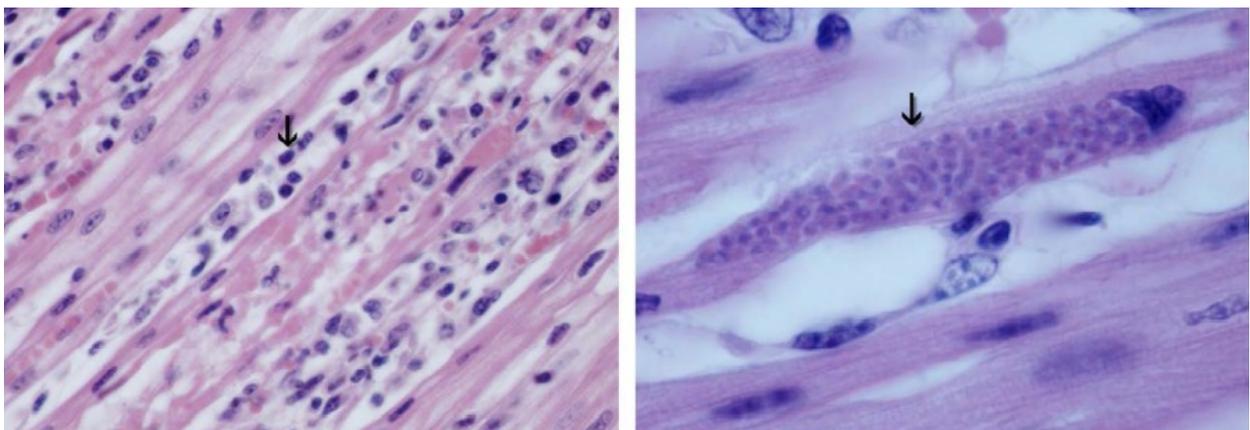


Figura 12. Epatite e necrosi focale in un feto di 5 mesi (fonte: Dubey et al., 2006).



*Figura 13.* A sinistra: Miocardite, necrosi focale e infiltrazione di cellule mononucleate associate a *N. caninum* in feti bovini infettati con infezione naturale. A destra: gruppo di tachizoiti intracellulari, indicati dalla freccia, in contesto di miocardite (fonte: Dubey et al., 2006).

## 1.7 Diagnosi

La diagnosi di neosporosi è complessa. Le tecniche diagnostiche a disposizione per evidenziare la presenza del parassita sono numerose. Esistono sia esami parassitologici diretti, che permettono di evidenziare la presenza del parassita nel campione analizzato, ed esami indiretti che valutano la risposta immunitaria nei confronti del parassita senza però evidenziarne la presenza e senza definirne la sua vitalità e infettività. Generalmente si ha sospetto di neosporosi sulla base dei rilievi clinici, come aumento della percentuale di aborti e di natimortalità nonché lesioni aspecifiche a livello placentare e storia dell'allevamento nei bovini e segni neurologici nel cane. Tuttavia, la diagnosi di sospetto deve essere confermata con uno o più test diretti o indiretti. Attualmente le procedure diagnostiche si basano sulla ricerca diretta del parassita nel feto abortito e su quella indiretta nell'adulto.

### Diagnosi diretta

Gli esami parassitologici diretti disponibili per *N. caninum* sono: esame istologico, tecniche immunoistochimiche, tecniche biomolecolari (PCR), colture *in vitro*, esame coprologico.

Le tecniche diagnostiche dirette hanno il vantaggio di individuare l'eventuale presenza del parassita ma spesso lo stato di autolisi che caratterizza il materiale biologico da analizzare rende queste tecniche poco sensibili.

**La diagnosi istologica** permette di evidenziare sia il parassita sia le lesioni tissutali da esso causate. Questa tecnica prevede la colorazione con ematossilina-eosina di sezioni bioptiche prelevate a livello di SNC, dove *N. caninum* è eventualmente presente sotto forma di cisti tissutale oppure su materiale fetale e placentare in seguito ad aborto.

*N. caninum* è eventualmente evidenziabile come formazioni cistiche dalla parete spessa, di circa 4 µm di spessore, differentemente da quella di *T. gondii* il cui spessore è inferiore a 1 µm (Dubey e Lindsay, 1996). Al microscopio elettronico è inoltre possibile osservare altre differenze nella forma di tachizoita che permettono di distinguere *N. caninum* da *T. gondii*: i "rhoptries" di *N. caninum* sono elettrondensi mentre *T. gondii* presenta invece un aspetto alveolato e i "rhoptries" elettronlucidi (Buxton et al., 2002).

L'**immunoistochimica** si rivela funzionale, al contrario di altre tecniche, anche quando il campione a disposizione non fa parte del SNC, come nel caso di fegato, milza, cuore, polmoni, muscoli scheletrici, reni. Anch'essa, come la tecnica istologica, permette di evidenziare il parassita e le relative lesioni tissutali. In questi organi si può riscontrare *N. caninum* nella forma di tachizoita o pseudocisti. Questa tecnica diagnostica prevede l'utilizzo di anticorpi monoclonali o policlonali specifici per *N. caninum*. Il siero policlonale anti- *N. caninum* deriva dal siero di conigli immunizzati con tachizoiti derivati da colture cellulari. Episodi occasionali di debole cross-reazione dell'antisiero di *T. gondii* sono possibili (Dubey e Lindsay, 1996). Questa tecnica però ha dimostrato di avere una sensibilità più bassa rispetto ad altre tecniche diagnostiche.

Attualmente molto utilizzate sono anche le **tecniche biomolecolari**. La **PCR** è una tecnica altamente sensibile, più sensibile rispetto alla tecnica istologica e a quella immunoistochimica, nell'identificazione di *N. caninum* in una vasta varietà di tessuti, soprattutto su organi fetali ma non solo: tessuti di feti abortiti, sangue, latte, seme di toro e persino liquido amniotico, liquido cerebrospinale, feci contaminate da oocisti. Esistono infatti diversi protocolli utilizzati per la ricerca di *N. caninum*, sviluppati per avere un risultato diagnostico anche in casi di scarsa qualità del DNA e di componenti inibitorie presenti nell'estratto. La sensibilità della PCR si è rivelata maggiore rispetto alle tecniche sia con campioni di tessuti fetali freschi sia fissati in formalina o in paraffina (Baszler et al., 1999). Può risultare falsamente negativa se il campione di feto presenta autolisi o mummificazione.

Recentemente sono stati sviluppati dei protocolli PCR per quantificare il DNA di *N. caninum* presente nel campione. Questi protocolli sono utili per esaminare la patogenesi della neosporosi bovina e per valutare l'efficacia dei vaccini e delle terapie (Dubey et al., 2006).

La PCR permette di amplificare delle sequenze target di geni prestabiliti dal materiale genetico estratto dal campione. I geni target utilizzati con gli isolati NC-1, NC-2, NC-3, NC-Liv, BPA-1, NC-SweB1 sono diversi e sono i seguenti. Alcuni sono sequenze del rDNA (18S rDNA, 28S rDNA, ITS1), altri target includono il gene pNc5 e il gene 14-3-3. Questi target sono scelti per il loro carattere di alta ripetitività che li rende geni specie-specifici (Dubey et al., 2006).

Il campione amplificato mediante PCR può essere utilizzato per successive indagini di genotipizzazione e sequenziamento.

**Esame copromicroscopico:** nel cane la diagnosi può essere eseguita tramite un esame coprologico (eseguito ai fini diagnostici esclusivamente in questa specie) che permette di

ricercare oocisti non sporulate nelle feci. Questo test risulta però essere poco sensibile, per cui nel cane viene generalmente utilizzato un kit ELISA competitivo (Capelli et al., 2014).

**Test in vitro:** vista la sua spiccata aspecificità cellulare, è possibile isolare *N. caninum* su colture cellulari partendo dal tessuto nervoso o dalle formazioni cistiche di ospiti intermedi. Il successo dell'isolamento cellulare dipende dal numero di parassiti presente e dalla capacità dell'operatore di digerire correttamente e sufficientemente il tessuto di partenza e la parete cistica in modo da liberare i parassiti. I limiti di questo tipo di tecnica risiedono principalmente nella capacità di mantenere la coltura cellulare priva da contaminazioni per più giorni, in modo da consentire al parassita di penetrare la cellula, replicarsi e romperla liberando in questo modo numerosi tachizoiti visibili al microscopio. *N. caninum* può anche essere isolata in topi di laboratorio partendo dallo stesso materiale descritto per le colture cellulari.

## Diagnosi indiretta

Gli esami parassitologici indiretti sono i **test sierologici** (IFAT, ELISA con avidity test ed ELISA).

Essendo basati sulla ricerca di anticorpi specifici presenti nel siero o nel latte (ricerca *in vivo*) o nelle carni (ricerca *post-mortem*), la sensibilità di questi test è maggiore in quanto non è influenzata dal grado di autolisi del campione. Le tecniche indirette sono spesso utilizzate per il controllo periodico di *N. caninum* in allevamento (Dubey and Schares, 2006).

La diagnosi sierologica post-abortiva sulle madri ha il vantaggio di poter essere eseguita *ante-mortem* ed è utile per fornire informazioni sullo stato epidemiologico dell'azienda (Dubey et al., 2006). Questa tecnica valuta la risposta anticorpale verso *N. caninum* di un singolo soggetto o di un gruppo di soggetti tramite il dosaggio delle IgM e delle IgG. Infatti, gli anticorpi specifici IgG e IgM appaiono nel sangue pochi giorni dopo l'infezione e hanno il picco, rispettivamente, a una settimana decrescendo fino a 3-6 mesi dall'infezione e a due settimane decrescendo fino a 4 settimane dall'infezione (Dubey et al., 2006). I test sierologici più attendibili, per via dell'alta specificità, sono il test IFAT (ImmunoFluorescence Antibody Test) e l'ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay). Tutti i test sierologici utilizzano antigeni dei tachizoiti. Infatti, non sono ancora disponibili test sierologici che utilizzano antigeni dei bradizoiti o delle oocisti (Dubey et al., 2006).

L'**IFAT**, che sfrutta antigeni cuticolari dei tachizoiti, è la tecnica più sensibile e per questo di elezione per la diagnosi di neosporosi. Il suo cut-off varia in base alla specie considerata: per la specie canina il cut-off è 1/50; per la specie bovina è di 1/200 e indicano un avvenuto contatto con il parassita mentre titoli maggiori di 1/640 indicano infezione in atto. Titoli maggiori di 1:1600 indirizzano a una diagnosi di aborto (McAllister 2016). L'IFAT è più datato rispetto al metodo ELISA e meno utilizzato in quanto più laborioso e meno standardizzabile. La possibilità di esprimere un titolo anticorpale lo rende adatto come test di conferma nel caso il test ELISA fosse dubbio.

L'**ELISA avidity test** è in grado di distinguere le infezioni acute (bassi livelli di IgG) da quelle croniche (alti livelli di IgG) ma è meno efficace dell'ELISA tradizionale (Bjorkman et al., 1996).

L'ELISA è una tecnica permette di analizzare campioni sia di sangue sia di latte, sia individuali sia di massa. È quindi la tecnica di elezione per svolgere screening epidemiologici. Nel caso dei campioni di massa, il risultato positivo indica una percentuale di infezione in allevamento del 15-20% (Dubey et al., 2006).

La diagnosi sierologica può essere utilizzata, oltre che per validare i test diretti, per l'accertamento di infezione transplacentare in vitelli pre-colostrati nati sani da madri infette. Nei vitelli post-colostrati è invece necessario eseguire il test una seconda volta dopo 25-30 giorni per osservare un'eventuale sieroconversione che testimonierebbe l'infezione oppure eseguire un dosaggio di IgM, che non vengono trasmesse tramite colostro.

È possibile utilizzare la sierologia per indagare lo stato di infezione anche nei feti abortiti prelevando fluidi fetali come il liquido pleurico e pericardico.

I kit ELISA possono essere utilizzati anche con campioni di latte ma si deve tenere conto che gli anticorpi nel latte compaiono tardivamente rispetto al siero, sono meno concentrati, e affinché il risultato sia positivo almeno il 10-15% di animali devono essere sieropositivi (Guido et al., 2016). La sensibilità è infatti al massimo del 61% e la specificità del 92% (Bartles et al., 2005) Il test è però economico e il campione non è indaginoso da prelevare.

## 1.8 Prevenzione profilassi e terapia

Le misure di profilassi per *N. caninum* sono mirate al mantenimento dello stato di allevamento indenne, per le aziende già indenni, e al risanamento dell'azienda, per le aziende infette, tramite una migliore gestione manageriale.

Per quanto riguarda gli allevamenti considerati indenni, le misure preventive sono volte a non permettere l'ingresso del parassita in azienda e consistono in:

- Quarantena e test sierologico, con esito negativo, prima di permettere l'ingresso di nuovi capi in azienda; predilezione della rimonta interna, acquistare solo da aziende negative che effettuano un piano di controllo
- Prevenzione della trasmissione orizzontale tenendo i cani lontani dal mangime, dall'acqua e dai pascoli dei bovini
- Impedire l'ingresso a cani vaganti, limitare il numero di cani in azienda ed evitare cucciolate in azienda
- Incenerire placente e involgini fetali abortiti e non lasciarle incustodite in azienda
- Non alimentare i cani con carne cruda né con placente o materiali fetali abortiti
- Riduzione del rischio di trasmissione tramite acqua contaminata impedendo ai bovini di bere da fonti di acqua stagnante e assicurando un rifornimento continuo di acqua
- Utilizzare rodenticidi

Per gli allevamenti in cui è nota la presenza di *N. caninum*, al fine di ridurre il rischio di aborto, si aggiungono alle misure preventive sopra elencate anche le seguenti:

- Esecuzione del "testing and culling": gli animali infetti sono reservoir dell'infezione e pertanto considerate in grado di diffondere l'infezione ad altri bovini.
- La scelta di macellare tutti gli animali positivi non è però spesso economicamente sostenibile; quindi, spesso si ricorre a soluzioni alternative quali:
- Inseminare i bovini sieropositivi esclusivamente con seme da carne
- Escludere i bovini sieropositivi dalla riproduzione

Per le bovine ad alta genealogia è possibile ricorrere alla pratica dell'embryo-transfer scegliendo delle bovine riceventi sieronegative. Uno studio sulla trasmissione di *N. caninum* per via verticale indica l'embryo-transfer come metodo di controllo per prevenire la trasmissione verticale (Baillargeon et al., 2001).

La mancanza di informazioni complete su entrambi i cicli di *N. caninum* (domestico e selvatico) e sul range degli ospiti limita l'efficacia delle misure di controllo.

Per quanto riguarda la terapia, non sono ad oggi disponibili efficaci trattamenti terapeutici per l'infezione da *N. caninum*. Pertanto, è auspicabile la profilassi vaccinale.

L'unico vaccino ad oggi disponibile verso *N. caninum* negli USA ma non registrato in Italia è *Bovilis® Neoguard*, un vaccino inattivato i cui antigeni derivano da tachizoiti, da somministrare alla vacca durante le prime fasi di gestazione. I produttori di questo vaccino lo hanno recentemente ritirato dal mercato per via della mancanza di dati convincenti riguardo l'efficacia nella prevenzione degli aborti associati a *N. caninum* (Lindsay e Dubey, 2020). Sebbene una ricerca condotta nel 2004 in Costa Rica dimostrasse che l'efficacia vaccinale di questo vaccino fosse "ragionevole" (Romero et al., 2004), un'altra ricerca condotta più recentemente in cinque aziende di bovine da latte in Nuova Zelanda, dove il vaccino era inizialmente disponibile, ha dimostrato che la prevenzione contro il rischio di aborto negli animali vaccinati non è statisticamente significativa; solo in alcune aziende l'efficacia vaccinale si è dimostrata significativa (Weston et al., 2012).

Un altro vaccino attenuato è attualmente oggetto di studi ma, nonostante i buoni risultati a livello sperimentale, non se ne prevede la commercializzazione a breve termine per la difficoltà di garantirne stabilità e innocuità (Rojo-Montejo et al., 2013).

La vaccinazione ha lo scopo di proteggere gli animali sieronegativi prima della gestazione dalle trasmissioni esogena e orizzontale ma non ci sono sufficienti dati sulla prevenzione nei confronti della trasmissione endogena (Reichel et al., 2015).

## 2. PARTE GENERALE: *Toxoplasma gondii*

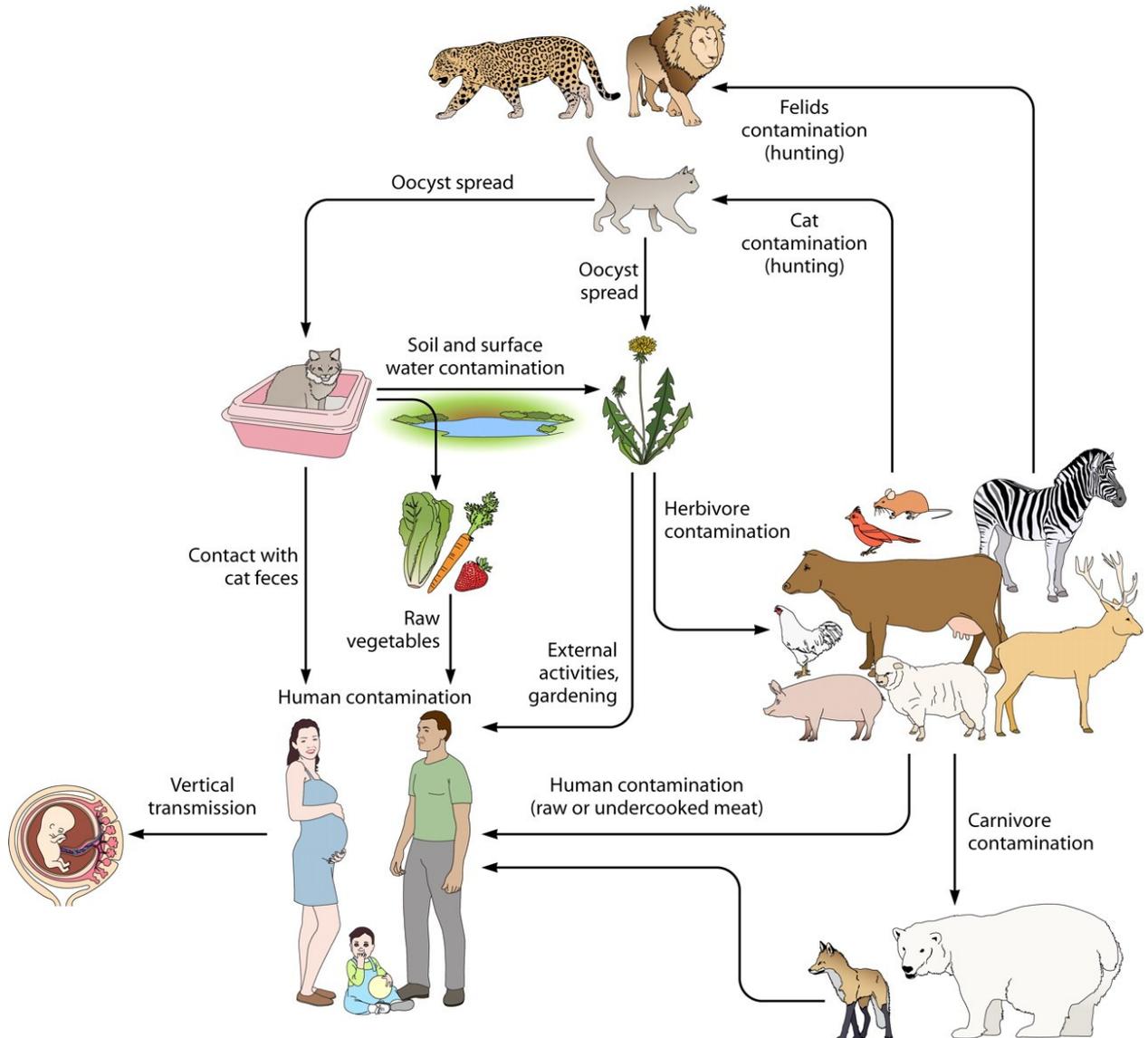


Figura 14. Ciclo biologico di *T. gondii* (fonte: Robert-Gangneux et Dardé, 2012).

## 2.1 Caratteristiche generali di *T. gondii*

*Toxoplasma gondii* è un parassita protozoo la cui scoperta risale al 1908 in Nord Africa ed è attribuita agli scienziati francesi Nicolle C. e Manceaux L. (Dubey, 2008). Il suo nome, attribuitogli l'anno successivo alla sua scoperta, deriva dalla sua forma ad arco o semiluna (dal greco: tòxon = arco e plasma = forma di vita) e dallo *Ctenodactylus gundi*, il roditore africano in cui per la prima volta *T. gondii* è stato isolato (Dubey, 2008).

*T. gondii* è ubiquitario, a diffusione cosmopolita, e i suoi ospiti sono gli animali a sangue caldo, inclusi mammiferi e uccelli (Robert-Gangneux et Dardé, 2012). È causa di aborto principalmente nei piccoli ruminanti ma anche nell'uomo, in cui è inoltre agente di toxoplasmosi. Il suo carattere zoonotico e abortivo fa sì che il controllo e la gestione di questo parassita siano di estrema importanza a livello globale.

## 2.2 Tassonomia

Classificato nella sottoclasse dei coccidi, phylum *Apicomplexa*, (Frenkel et al., 1970), *T. gondii* presenta gran parte della propria filogenesi in comune con *N. caninum*. Essi hanno infatti in comune regno (Protista), phylum (*Apicomplexa*), classe (*Sporozoa*), sottoclasse (*Eucoccidioria*), subordine (*Eimeriorina*) e famiglia (*sarcocystiidae*). Differiscono per genere e specie: il genere *Toxoplasma* contiene una sola specie: *gondii* (Taylor et al., 2017).

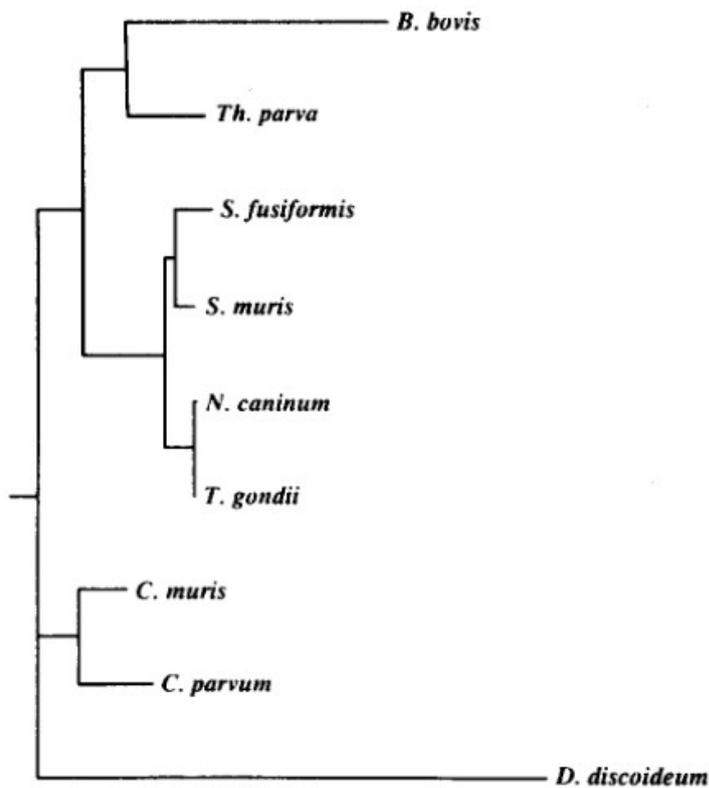


Figura 15. Filogenesi di *T. gondii*. Si noti la vicinanza con *N. caninum* (fonte: Holmdahl et al., 1994).

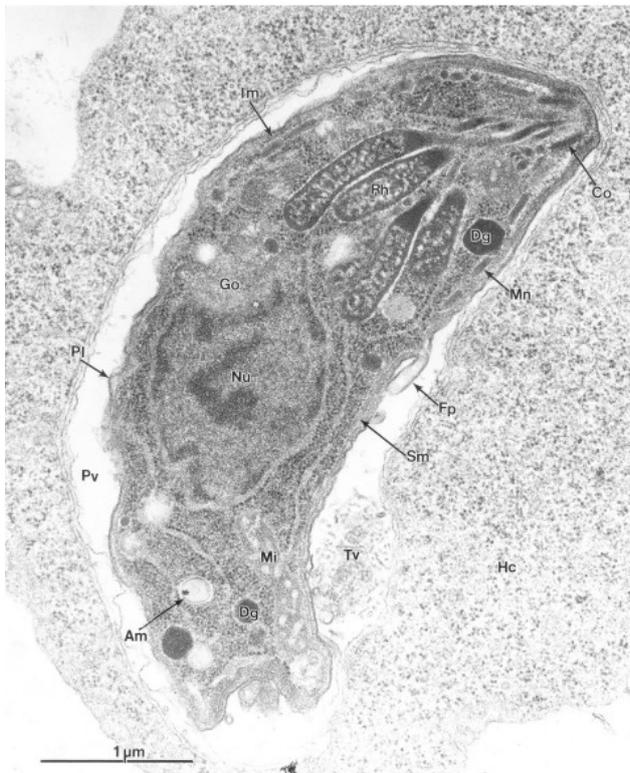
Gli studi genetici sulla struttura della popolazione di *T. gondii*, sviluppati soprattutto a partire dagli anni 2000, ne hanno rivelato una struttura complessa e difficile da classificare. Esistono 3 genotipi principali (I, II, III) che variano per potere patogeno e per virulenza espressa nei topi da laboratorio (la I ha virulenza maggiore), ai quali si aggiungono gli aplotipi X e A. Alcuni di questi genotipi sono limitati alla fauna selvatica (Attias et al., 2020).

## 2.3 Struttura e caratteristiche morfologiche

Esistono tre forme infettive del parassita: la forma invasiva altamente replicante di tachizoita, la forma lentamente replicante, “di resistenza”, detta bradizoita e contenuta nelle cisti tissutali e infine la forma ambientale di oocisti.

**Il tachizoita** (Figura 16) è la forma invasiva presente in circolo e ha velocità proliferativa elevata. Ha forma a semiluna e dimensioni di 4-6 x 2-3  $\mu\text{m}$ . Possiede una membrana esterna, tutte le componenti delle cellule protozoarie e un complesso apicale, rhoptries e micronemi (Piergili Fioretti, 2020).

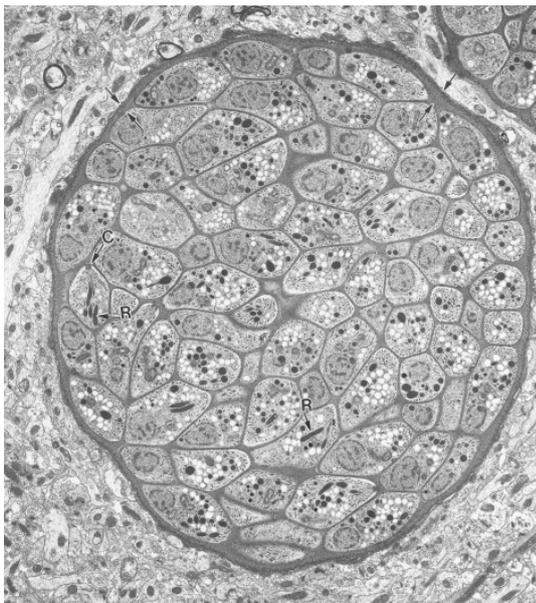
Si moltiplica in sede intracellulare, dividendosi in due per endoduogenia (Dubey, 2008), all'interno del vacuolo parassitoforo contenuto nella pseudocisti (struttura rotondeggiante di 10-30  $\mu\text{m}$ ) ed è in grado di invadere e moltiplicarsi in tutti i tipi di cellule di tutti i vertebrati a sangue caldo (Robert-Gangneux et Dardé, 2012).



**Figura 16.** Immagine TEM di un tachizoita di *T. gondii* in essudato peritoneale di topo. “Am”: granuli di amilopectina; “Co”: conoide; “Dg”: granuli elettrondensi; “Fp”: proiezione del tachizoita nel plasmalemma; “Go”: apparato di Golgi; “Hc”: citoplasma della cellula ospite; “Im”: membrana interna; “Mi”: mitocondrio; “Mn”: microneme; “Nu”: nucleo; “Pl”: plasmalemma; “Pv”: vacuolo parassitoforo; “Rh”: rhoptry; “Sm”: microtubulo subpellicolare; “Tv”: membrana tubulovesicolare (fonte: Hills et al., 2005).

**Il bradizoita** è una forma di sopravvivenza a lento metabolismo che deriva dalla trasformazione del tachizoita. Ha dimensioni di 2,5  $\mu\text{m}$  (Hill et al., 2005). Risiede nelle cisti tissutali (Figura 17), grandi dai 10  $\mu\text{m}$  (quelle più giovani) ai 100  $\mu\text{m}$  (per quelle più datate), che contengono un numero maggiore di bradizoiti, e sono localizzate o a livello di sistema nervoso, dove hanno forma sferica, o nelle cellule muscolari dove hanno forma più allungata (Robert-Gangneux et Dardé, 2012). Le cisti presentano una doppia parete sottile dello spessore di circa 1  $\mu\text{m}$  (Hill et al., 2005). Le cisti tissutali sono distrutte dalla tripsina e dalla pepsina ma i bradizoiti, al contrario dei tachizoiti e delle cisti tissutali, sono resistenti a tali sostanze e di conseguenza all'acido gastrico. Questa caratteristica è di estrema importanza nel ciclo biologico del parassita in quanto ne permette la trasmissione per ingestione anche in ospiti carnivori (Dubey, 2008).

**Le oocisti** sono la forma libera emessa tramite le feci in ambiente. Hanno dimensioni tra i 10-13  $\mu\text{m}$ , forma ellissoidale e contengono, quando non ancora sporulate, uno sporonte. Dopo alcuni giorni in ambiente esterno le oocisti sporulano, diventando infettanti, e tramite la sporogonia hanno origine due sporocisti ognuna contenente 4 sporozoit (Hill et al., 2005). La parete dell'oocisti è un multistrato estremamente resistente che la rende adatta a sopravvivere nell'ambiente esterno (Robert-Gangneux et Dardé, 2012).



*Figura 17.* Immagine TEM di una cisti tissutale nel cervello di un topo 6 mesi post-infezione. Indicata dalla freccia si nota la sottile parete della cisti; numerosi bradizoiti ciascuno con un conoide ("C"); un rhoptrio elettron denso ("R"). Scala bar 3  $\mu\text{m}$  (fonte: Hill et al., 2005).

## 2.4 Ciclo biologico

Il ciclo biologico di *T. gondii* (Figura 18) è stato completamente compreso e quindi descritto solo negli anni '60 (Robert-Gangneux et Dardé, 2012). È un ciclo dixeno, ovvero si svolge in due ospiti differenti: l'ospite definitivo, generalmente il gatto, in cui il parassita attua una riproduzione sessuata, e l'ospite intermedio, qualsiasi mammifero a sangue caldo, uccelli e rettili, in cui il parassita attua una riproduzione asessuata detta schizogonia (Robert-Gangneux et Dardé, 2012). Il parassita può essere trasmesso da ospite definitivo a intermedio e viceversa ma può anche essere trasmesso da un ospite definitivo ad un altro ospite definitivo in quanto l'ospite definitivo è ospite completo, ovvero funge anche da ospite intermedio, oppure da un ospite intermedio a un altro ospite intermedio tramite due vie: verticale (congenita o diaplacentare) e orizzontale (carnivorismo).

### Ospite definitivo

Gli ospiti definitivi di *T. gondii* sono i felini, sia domestici sia selvatici, i quali si possono infettare sia ingerendo oocisti sporulate (via oro-fecale) sia ingerendo tessuti di ospiti intermedi contenenti cisti tissutali (carnivorismo). I felini vengono definiti "ospiti completi" dal momento che sostengono contemporaneamente sia la riproduzione di tipo asessuato (che avviene anche negli ospiti intermedi-fase extraintestinale") che sessuato (gametogonia- "fase intestinale").

L'infezione per carnivorismo, ovvero per ingestione di cisti tissutali porta alla liberazione di bradizoiti in sede intestinale i quali, convertono a tachizoiti, invadono le cellule epiteliali intestinali e replicano tramite la schizogonia che dà origine ai merozoiti i quali, a loro volta, invadono altre cellule epiteliali e attuano un nuovo ciclo di schizogonia. I merozoiti si trasformano in gameti e danno luogo alla riproduzione sessuata detta gametogonia, dalla quale origina uno zigote che diviene oocisti.

Le oocisti espulse in ambiente con le feci esterno sporulano in circa 2-3 giorni o al massimo 5 giorni, variabili in base a fattori ambientali (temperature miti e ambienti umidi favoriscono una più rapida sporulazione) (Lindsay et al., 1999). Il periodo di prepatenza è in questo caso di 1-2 settimane (Dubey, 2008). Contemporaneamente nell'ospite completo avviene anche la riproduzione asessuata in cui i tachizoiti (derivati sia dalla trasformazione di merozoiti contenuti nelle oocisti sporulate, che da bradizoiti all'interno di cisti tissutali) si diffondono nell'organismo per via linfematogena all'interno dei macrofagi. Dopo aver compiuto uno o più cicli extra

intestinali (il parassita non ha specificità cellulare), *T. gondii* determinerà la rottura delle cellule infettate andando in questo modo ad invaderne altre. La replicazione e la morte cellulare indotta si interrompono solo nel momento in cui si ha l'attivazione del sistema immunitario dell'ospite. A questo punto il parassita "muta" a bradizoita e si formano le cisti tissutali e le pseudocisti principalmente a livello di SNC e muscoli scheletrici, che permarranno per tutta la vita dell'ospite.

L'ospite definitivo elimina le oocisti una sola volta nella vita in quanto, dopo il primo contatto con il parassita, il suo sistema immunitario risponde inducendo una risposta immunitaria cellulo-mediata duratura.

### **Ospite intermedio**

Gli ospiti intermedi di *T. gondii* sono numerosissimi, primi tra tutti gli ovicaprini ma come già detto anche l'essere umano può essere un ospite intermedio.

Gli ospiti intermedi possono infettarsi, similmente agli ospiti definitivi, tramite l'ingestione di cisti tissutali per carnivorismo o tramite l'ingestione di oocisti per via fecale-orale, ma anche per via verticale (transplacentare o congenita).

Nella via di trasmissione verticale la forma infettante è il tachizoita che, penetrato nell'organismo, può superare la membrana placentare e causare la trasmissione congenita. È sempre il tachizoita che può causare la diffusione dell'infezione tramite trasfusioni di sangue e trapianti di organi, soprattutto in campo umano.

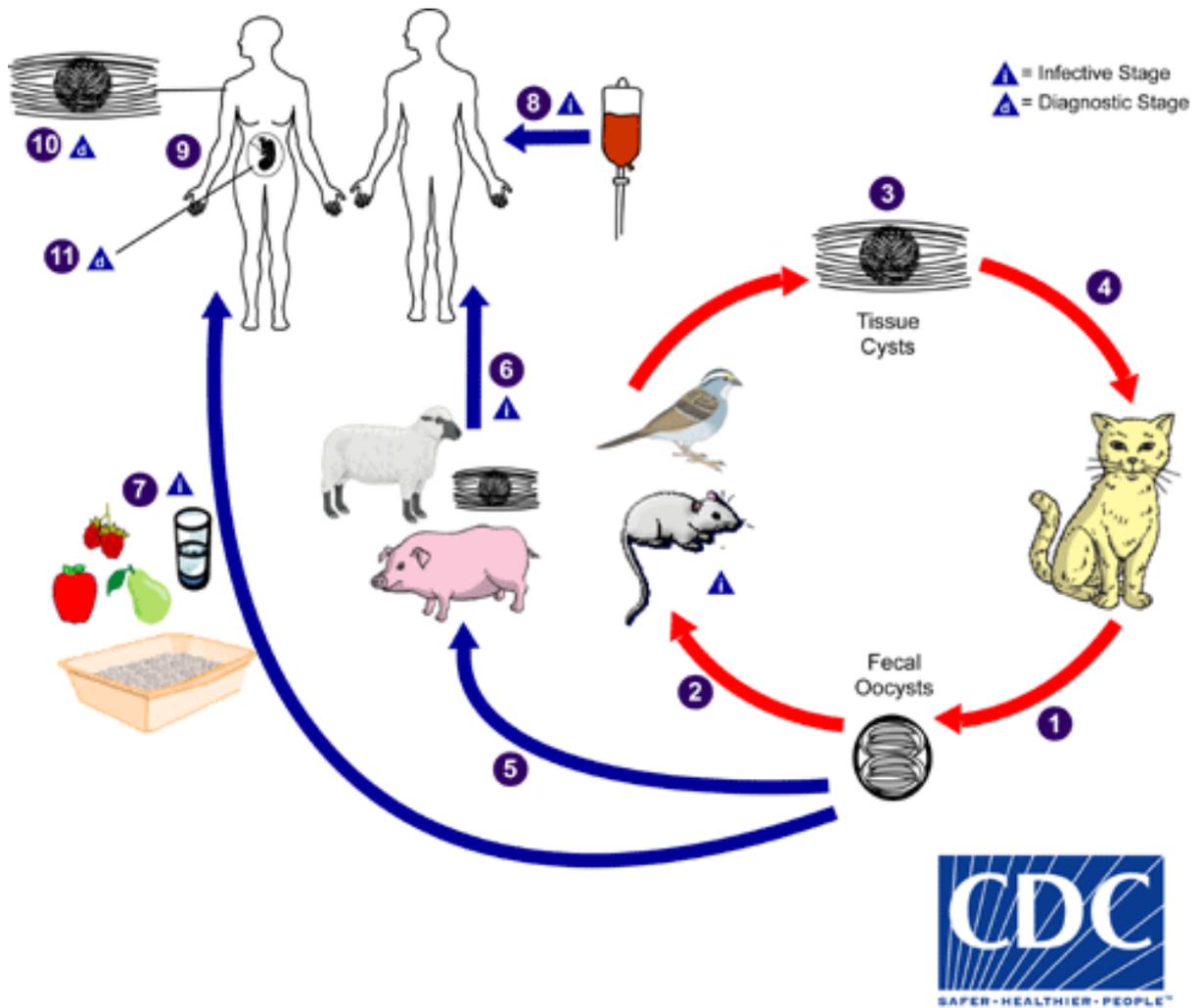


Figura 18. Ciclo biologico di *T. gondii* (fonte: CDC website <https://www.cdc.gov/dpdx/toxoplasmosis>).

## 2.5 Epidemiologia

*T. gondii* è cosmopolita e deve la sua larga diffusione alla sua enorme plasticità biologica delle potenziali specie ospite e alle numerose possibilità offerte dal suo ciclo biologico. È diffuso con diversa sieroprevalenza sia negli animali domestici che da reddito, sia nella fauna selvatica, sia nell'uomo, sia addirittura nei mammiferi marini come lontre, delfini, foche e trichechi (Conrad et al., 2005). Nell'uomo la percentuale della popolazione mondiale infetta da *T. gondii* è stimata essere attorno al 25-30% (Montoya e Liesenfeld, 2004).

La toxoplasmosi è la zoonosi simbolo del modello "One medicine-One Health", a sottolineare la stretta interconnessione tra medicina umana e veterinaria. È infatti considerata una delle maggiori cause di "food-born disease" e "water-born disease", ovvero a infezioni legate all'ingestione di cibo o acqua contaminati da oocisti sporulate (Pereira et al., 2010).

### Prevalenza

I genotipi di *T. gondii* presentano diverse aree di distribuzione: il genotipo II è quello maggiormente diffuso in Europa e negli USA (80% delle infezioni), sia nelle infezioni che colpiscono l'uomo che gli animali, mentre il genotipo I risulta essere piuttosto raro, mentre il III è piuttosto presente negli animali selvatici (Battisti et al., 2018). Per quanto riguarda i cosiddetti genotipi atipici questi risultano essere maggiormente diffusi (<5%) nella fauna selvatica in paesi come Africa, Asia e Sud America e sono stati segnalati numerosi casi di toxoplasmosi acuta grave anche in soggetti immunocompetenti legati a queste varianti (Piergili Fioretti et al., 2020). La prevalenza negli animali produttori di carni varia in base alla specie e ad altri fattori di rischio, analizzati in seguito. La maggiore sieroprevalenza è registrata negli allevamenti ovi-caprini, con picchi oltre l'88% negli ovini (Halos et al., 2010) e 77% nei caprini (Dubey et al., 2011). Negli allevamenti suinicoli intensivi la sieroprevalenza è inferiore al 5% (Dubey et al., 2005). La sieroprevalenza negli allevamenti industriali di pollame e nelle uova è praticamente nulla, mentre è molto alta negli allevamenti all'aperto, anche del 100% (Robert-Gangneux et Dardé, 2012). La sieroprevalenza resta bassa anche per quanto riguarda gli equini (Robert-Gangneux et Dardé, 2012). La sieroprevalenza nei bovini è molto variabile, dal 2 al 92% (Tenter et al., 2000).

## **Fattori di rischio**

Tra i vari fattori di rischio ci sono:

- Management dell'allevamento
- Tipologia dell'allevamento: gli allevamenti semintensivi o bradi o con transumanza favoriscono l'infezione
- Presenza di gatti in allevamento le cui feci possono contaminare il mangime
- Norme di biosicurezza tra cui l'applicazione di un buon sistema di derattizzazione
- Età degli animali allevati (l'infezione è minore negli agnelli giovani rispetto agli adulti ad esempio) (Halos et al., 2010)

## 2.6 Patogenesi, segni clinici e rilievi patologici

I danni provocati da *T. gondii* sono dovuti all'uso di enzimi litici per penetrare nelle cellule ospiti, all'uso della toxotossina che provoca lisi cellulare e alla replicazione nelle cellule ospiti che ne provoca rottura meccanica. Il quadro istopatologico è simile in tutti gli organi colpiti: si scatena un processo infiammatorio non purulento con formazione di aree di necrosi e danno tissutale e d'organo (Benavides et al., 2017). L'inizio della risposta immunitaria dell'ospite coincide con la trasformazione in forma cistica del parassita.

La risposta cellulo-mediata è protettiva e di lunga durata: si è osservato che l'IFN- $\gamma$  inibisce la moltiplicazione intracellulare dei tachizoiti ed è efficace sia in fase attiva di proliferazione sia in fase cronica di forma cistica (Oura et al., 1993). Questo fa sì che le manifestazioni cliniche siano tali solo durante la prima infezione nei soggetti immunocompetenti.

L'infezione può avere diversi decorsi, da asintomatico, come accade spesso negli animali da reddito, a sintomatico grave, in base allo stato immunitario dell'ospite, alla virulenza del ceppo, alla dose infettante, all'età del soggetto e ad alcuni stati fisiologici (es. gravidanza). Nei soggetti immunocompetenti può presentarsi o in forma asintomatica nella maggior parte dei casi (80-90%) oppure con lievi manifestazioni di linfadenopatia, linfocitosi, febbre patologie d'organo tra cui uveiti (gatto), forme polmonari (cane), meningoencefaliti (equini) e altre forme nervose (Piergili Fioretti et al., 2020).

Nei soggetti immunocompromessi, come gatti FIV/FelV +, l'infezione è sistemica e comporta danni d'organo più estesi. Nell'uomo, nei soggetti affetti da AIDS, ad esempio, è tra le prime cause di morte (Hill et al., 2005).

Nell'uomo può presentarsi in forma asintomatica o, soprattutto nei soggetti immunocompromessi, in forma oculare di corioretinite o in forme nervose di encefalite e idrocefalo con calcificazioni intracraniche (in bambini nati da madri che hanno acquisito l'infezione durante il secondo o terzo trimestre di gravidanza) (Montoya e Liesenfeld, 2004).

La trasmissione transplacentare può interferire con la gravidanza portando a morte embrionale, riassorbimento fetale, aborto spontaneo, danni fetali, questi ultimi variabili in base allo stadio della gravidanza per via del diverso stato immunitario della madre e del feto nelle varie fasi, analoghe nell'uomo e negli animali.

La possibilità di infezione del feto dipende dallo stadio gestazionale nel quale avviene l'infezione: minore nel primo trimestre di gravidanza e maggiore nelle ultime settimane di gestazione per via del maggior afflusso sanguigno placentare e della minore presenza di IFN- $\gamma$  nelle ultime fasi della gravidanza (Oura et al., 1993). La gravità del danno fetale è invece inversa allo stadio gestazionale in cui avviene l'infezione: riassorbimento o aborto embrionale sono molto probabili nel primo trimestre; morte, aborto fetale, natimortalità o nascita di neonati prematuri e malati, mummificazione fetale nel secondo trimestre; nascita di soggetti clinicamente sani ma congenitamente infetti se l'infezione avviene nel terzo trimestre (Blewett et al., 1982) (Innes et al., 2009).

L'infezione congenita per recrudescenza, frequente in *N. caninum*, è possibile ma infrequente in *T. gondii* (Innes et al., 2009).

La toxoplasmosi negli animali da reddito ha anche un significato sanitario legato alla presenza di cisti nelle carni, soprattutto di ovicaprini, suino ed equini, le quali, se crude o poco cotte, possono trasmettere *T. gondii* all'uomo (Jones et al., 2012).

## 2.7 Diagnosi

Esistono diverse metodiche di laboratorio sia dirette che indirette che permettono di diagnosticare l'infezione da *T. gondii*.

### Diagnosi diretta

La **diagnosi istologica** viene effettuata su campioni prelevati da organi target (se l'infezione è acuta: linfonodi, milza, fegato, polmone, pancreas; se l'infezione è cronica: sistema nervoso) tramite le procedure routinarie, dalla fissazione alla clorazione con ematossilina eosina (Piergili Fioretti et al., 2020).

La **diagnosi coprologica** per la ricerca di oocisti nelle feci di gatto è ritenuta di scarso significato poiché raramente il gatto presenta sintomi e quindi è improbabile che venga richiesto un esame coprologico per la ricerca di oocisti in routine. Anche le **prove biologiche *in vitro*** permettono la diagnosi di *T. gondii*: la presenza del parassita nonché di aree di lisi cellulare su colture cellulari è visibile già dopo 48-72 ore dall'inoculo.

Le **tecniche biomolecolari** (PCR, Nested PCR, Real-Time PCR) sono in grado di evidenziare il DNA del parassita nel campione analizzato. L'amplificazione del gene B1 nei fluidi corporei e nei tessuti si è rivelata efficace per la diagnosi di toxoplasmosi congenita, oculare, cerebrale e generalizzata (Montoya e Liesenfeld, 2004). Tuttavia, il maggior limite di questa tecnica risiede nella difficoltà ad estrarre DNA da campioni derivanti da matrici diverse e in cui la distribuzione delle cisti è random. Non sempre quindi un campione negativo in PCR rispecchia la realtà poiché per una corretta estrazione di DNA il materiale di partenza è limitato (25 mg per i classici kit di estrazione di DNA da carne presenti in commercio), la digestione del tessuto muscolare può trascinare dentro al campione di DNA degli inibitori degli enzimi utilizzati per la PCR, ecc... L'ideale, attualmente, è abbinare tecniche di biologia molecolare ad un test sierologico, in quanto questo dà indicazione di un avvenuto contatto con il parassita.

A oggi l'unico "gold standard" per definire in modo inequivocabile la presenza di *T. gondii* vivo e infettante in un qualsiasi materiale biologico di partenza resta la **prova *in vivo*** su animali da laboratorio.

## Diagnosi indiretta

La diagnosi indiretta consiste nel dosaggio di IgG e IgM che si formano in seguito alla risposta anticorpale. La prima risposta anticorpale si sviluppa contro antigeni cuticolari e, solo in seguito, verso antigeni citoplasmatici. Pertanto, i test che ricercano gli anticorpi verso la forma di tachizoita, quali Dye test e IFI, sono i più precoci e considerati il gold standard per la diagnosi clinica. L'**ELISA** rileva anticorpi contro antigeni citoplasmatici e, tra le metodiche sierologiche questo è certamente il test più sensibile e specifico e anche il più adatto per indagini epidemiologiche.

Per diagnosticare l'infezione da *T. gondii* è necessario rilevare sia le IgM sia la sieroconversione delle IgG specifiche. Le IgA, prodotte precocemente rispetto alle IgM, sono considerate marker di infezione acuta (Liu et al., 2015).

La diagnosi sierologica post-abortiva sulle madri non è sufficiente per attribuire la causa dell'aborto a *T. gondii*: la sieropositività trovata potrebbe essere attribuita a un'infezione cronica che può non causare aborto. Si rende quindi necessaria una conferma di positività nel materiale abortito mediante PCR.

La tecnica **IgG Avidity ELISA** è la tecnica attualmente utilizzata per distinguere l'infezione acuta dall'infezione cronica in quanto altamente sensibile (de Ori et al., 1995).

I neonati che mostrano sieropositività prima dell'assunzione del colostro hanno contratto l'infezione per via congenita. La positività nei neonati che hanno già assunto il colostro è attribuibile a *T. gondii* solo se un secondo test, eseguito a distanza di alcuni giorni, mostra una sieroconversione delle IgG (Hampton et al., 2015).

La diagnosi *post mortem* ha valore sanitario e viene eseguita tramite digestione acido-peptica o triptica (Mirza Alizadeh et al., 2018).

La finalità della diagnosi di toxoplasmosi animale è infatti sia la salvaguardia della salute animale sia di quella umana.

## 2.8 Prevenzione, profilassi e terapia

Le misure di profilassi per ridurre la diffusione dell'infezione si basano su:

- Controllo degli ospiti definitivi (gatti) tramite controllo delle popolazioni randagie o rinselvatichite
- Controllo negli ospiti intermedi a livello di produzione primaria tramite l'utilizzo di norme di biosicurezza (non permettere ai gatti l'accesso all'allevamento né ai mangimi o all'acqua di abbeverata, effettuare la derattizzazione)
- Diffusione dell'informazione circa norme igieniche di base per prevenire l'infezione (non consumare carne cruda o poco cotta, lavare bene frutta e verdura, non bere latte crudo, manipolare la terra e la lettiera del gatto seguendo appropriate norme igieniche, non alimentare il gatto con carni crude o poco cotte)

Le misure terapeutiche vengono utilizzate solo in cani e gatti. I farmaci disponibili sono attivi solo sulla forma di tachizoita ma non sulla forma cistica. Il farmaco di elezione è la clindamicina, efficace per prevenire la trasmissione congenita nel caso di infezioni acute e per eliminare o ridurre notevolmente il parassita, con trattamenti prolungati, dai soggetti cronicamente infetti (Araujo e Remington, 1974). È ideale per pazienti allergici ai sulfamidici. In alternativa sono efficaci in sinergia associazioni di sulfamidici e pirimetamina (Dubey, 2008). La spiramicina è utilizzata in modo preventivo nelle donne in gravidanza per ridurre la trasmissione del parassita dalla madre al feto (Demonts e Couvreur, 1974b).

Tabella 3: caratteristiche morfologiche, biologiche, antigeniche e genetiche di *N. caninum* e *T. gondii* a confronto.

<b>Caratteristiche</b>	<b><i>Neospora caninum</i></b>	<b><i>Toxoplasma gondii</i></b>
Ospite definitivo	Cane	Gatto
Ospite intermedio	Prevalentemente bovino	Mammiferi a sangue caldo, uccelli, rettili
Affinità per la tipologia di cellula ospite	Specificità per cellule intestinali, SNC, SNP	aspecificità cellulare
Sito di legame al glicosamminoglicano di superficie della cellula ospite	Proteoglicano di condroitinsolfato	Residui di eparansolfato
Rhoptries dei tachizoiti	Elettrodensi	Elettrolucenti
<b>Spessore della parete cistica</b>	<b>4 <math>\mu\text{m}</math></b>	<b>&lt;1 <math>\mu\text{m}</math></b>

## 3. PARTE SPERIMENTALE

### 3.1 Materiali e metodi

#### 3.1.1 Campionamento

La sieroprevalenza di *T. gondii* e *N. caninum* in allevamenti di piccoli ruminanti è stata studiata in precedenti studi a livello mondiale, europeo e italiano (Benavides et al., 2022; Mendoza-Morales et al., 2022; Nayeri et al., 2022). Il presente studio si focalizza sull'analisi della sieroprevalenza di *T. gondii* e *N. caninum* in piccoli ruminanti della regione Emilia-Romagna (Nord Italia).

Sono stati analizzati i sieri di 125 ovi-caprini, di cui 100 ovini e 25 caprini, provenienti da 24 allevamenti (Tabella 4).

Tabella 4: Descrizione allevamenti e animali

Allevamento	Specie	N°analizzati/ tot gruppo
Riolo Terme (RA)	Ovini	14/14
Faenza (RA)	Ovini	12/12
Faenza (RA)	Ovini	6/6
Faenza (RA)	Ovini	19/19
Brisighella (RA)	Ovini	3/3
Ravenna (RA)	Ovini	3/6
Ravenna (RA)	Ovini	2/2
Poggio Renatico (FE)	Caprino	1/1
Poggio Renatico (FE)	Caprino	1/1
Anzola dell'Emilia (BO)	Caprini	1/1
San Pietro in Casale (BO)	Ovini	3/5
Sasso Marconi (BO)	Caprino	1/1
Cesena (FC)	Caprini	3/3
Forlì (FC)	Caprini	1/1
Forlì (FC)	Caprini	1/1
Forlì (FC)	Caprini	3/7
Forlì (FC)	Ovini	7/14
Civitella di Romagna (FC)	Caprini	8/9
Civitella di Romagna (FC)	Caprini	2/2
Savignano sul Rubicone (FC)	Caprini	3/3
Modena (MO)	Ovini	2/2
Neviano degli Arduini (PR)	Ovini	2/2
Neviano degli Arduini (PR)	Ovini	2/4
Rimini (RN)	Ovini	25/96
<b>Totale: 24 allevamenti</b>		<b>125 capi</b>

### 3.1.2 Analisi sierologiche

I campioni analizzati sono stati forniti dall'Istituto Zooprofilattico dell'Emilia-Romagna, sede di Parma, nell'ambito delle attività di siero-sorveglianza per la brucellosi. La Tabella 4 riporta il numero di campioni analizzati per ciascun'allevamento. Tutti i campioni rappresentativi sono stati selezionati secondo criterio di casualità.

Per l'analisi sierologica, sono stati utilizzati 2 kit commerciale (IDEXX Neospora Ab; IDEXX Toxotest Ab), secondo le indicazioni della casa produttrice (Figura 19). La Tabella 5 riporta il materiale fornito con ciascuno dei kit e l'immagine successiva, Figura 20, lo rappresenta.

Il test sierologico utilizzato per svolgere questa ricerca è l'ELISA "IDEXX Neospora Ab", che permette di rilevare la presenza di anticorpi verso *Neospora caninum* in campioni di sangue, plasma e siero dei piccoli ruminanti. Il kit "IDEXX Neospora Ab" è un Elisa indiretto, costituito da piastre per la microtitolazione contenenti l'antigene inattivato titolato di *N. caninum* nelle quali il campione diluito di siero o plasma da testare va inserito e successivamente incubato. Durante l'incubazione eventuali anticorpi specifici per *N. caninum* presenti nel campione si legano all'antigene inattivato formando un complesso antigene-anticorpo. Eliminato il materiale in eccesso, al complesso viene aggiunto il coniugato diluito e, in seguito, la soluzione substrato. In base alla quantità di anticorpi la colorazione può diventare più o meno intensa. Coniugato e substrato servono evidenziare la presenza di un eventuale legame antigene-anticorpo allo spettrofotometro.



Figura 19. Immagine del Test commerciale IDEXX utilizzato in questo studio

Tabella 5. Kit e materiale utilizzati per la sierologia

Test <i>Neospora caninum</i> Ab – IDEXX Neospora	Test <i>Toxoplasma gondii</i> Ab – IDEXX Toxoplasma
diluenti per campioni e controlli (soluzioni 2, 3)	diluenti per campioni e controlli (soluzioni 2, 3)
controllo negativo	controllo negativo
controllo positivo	controllo positivo
soluzione di lavaggio	soluzione di lavaggio
coniugato non concentrato (enzima che si lega al complesso antigene-anticorpo, quando presente)	coniugato concentrato (10X) (enzima che si lega al complesso antigene-anticorpo, quando presente)
substrato TMB (si lega al coniugato legato al complesso antigene-anticorpo quando presente; questo determina il viraggio del colore della soluzione, apprezzabile all'osservazione)	substrato TMB (si lega al coniugato legato al complesso antigene-anticorpo quando presente e questo determina il viraggio del colore della soluzione, apprezzabile all'osservazione a occhio nudo)
soluzione bloccaggio (solitamente una soluzione a base di acido solforico, permette di terminare la reazione di legame tra il substrato e il complesso antigene-anticorpo)	soluzione bloccaggio (solitamente una soluzione a base di acido solforico, permette di terminare la reazione di legame tra il substrato e il complesso antigene-anticorpo)
piastre sensibilizzate con antigene di <i>N. caninum</i>	piastre sensibilizzate con antigene di <i>T. gondii</i> (micropiastre adesive con l'antigene p30 → da kit)
porta piastre	porta piastre

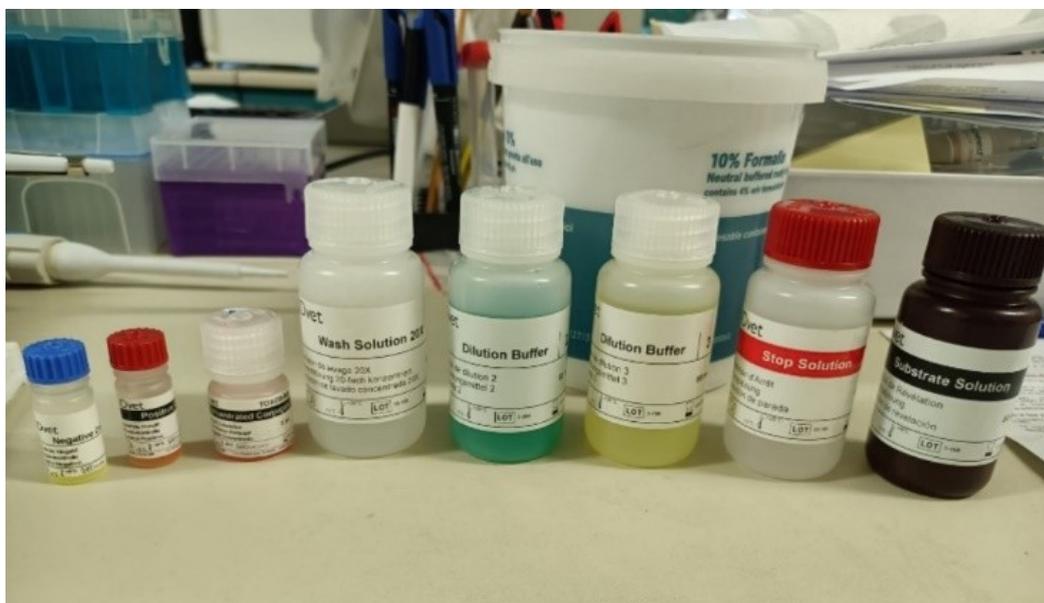


Figura 20. Reagenti fornite dal kit IDEXX. da sinistra a destra: controllo negativo, controllo positivo, coniugato concentrato, soluzione di lavaggio, diluente 2, diluente 3, soluzione di stop, soluzione substrato.

### 3.1.3 Sensibilità e Specificità

Entrambi i kit si dimostrano altamente affidabili in quanto, basandosi sui cut-off suggeriti dai produttori, i livelli di sensibilità (Se) e di specificità (Sp) sono risultati essere molto alti, entrambi oltre il 95%. In particolare, la sensibilità è del 96,1% ( $94,1\% < Se < 98,6\%$ ) e la specificità è del 100% (Alvarez-García et al., 2013).

### 3.1.4 Procedura

Prima di essere utilizzati, i campioni (Figura 21) e tutti i reagenti (Figura 20) sono stati portati a temperatura ambiente ( $18^{\circ}$ - $26^{\circ}$  C per *N. caninum* e  $21 \pm 5^{\circ}$  C per *T. gondii*). Stessa procedura è stata applicata ai campioni solitamente conservati a  $-20^{\circ}$  C dopo essere stati sierati il giorno dell'arrivo in laboratorio.

È stato tracciato uno schema su carta per l'identificazione dei campioni in base alla loro posizione nella piastra.

Sono state posizionate le piastre contenenti l'antigene specifico nell'apposito porta piastre in numero di pozzetti pari o superiore a: " $n^{\circ}$  campioni da testare + 4".

Sono stati aggiunti 90  $\mu$ L di soluzione di diluizione 2 in ciascun pozzetto utilizzato (Figura 22).

Sono stati aggiunti 10  $\mu$ L di controllo negativo in due pozzetti e 10  $\mu$ L di controllo positivo in altri due pozzetti. Sono stati aggiunti 10  $\mu$ L di campione di siero nei restanti pozzetti.

Le piastre sono state fatte vibrare per mescolare il contenuto dei singoli pozzetti.

Le piastre sono poi state coperte di carta di alluminio per evitare l'evaporazione e messe in incubatore in ambiente umido per 1 ora ( $\pm 5$  min.) a  $+ 37^{\circ}$  C ( $\pm 3^{\circ}$  C) per quanto riguarda le analisi di *N. caninum*; per 45 min ( $\pm 4$  min) a  $+ 21^{\circ}$ C ( $\pm 5^{\circ}$ C) per quanto riguarda le analisi di *T. gondii*.



Figura 22. Sieri ovis e caprini scongelati

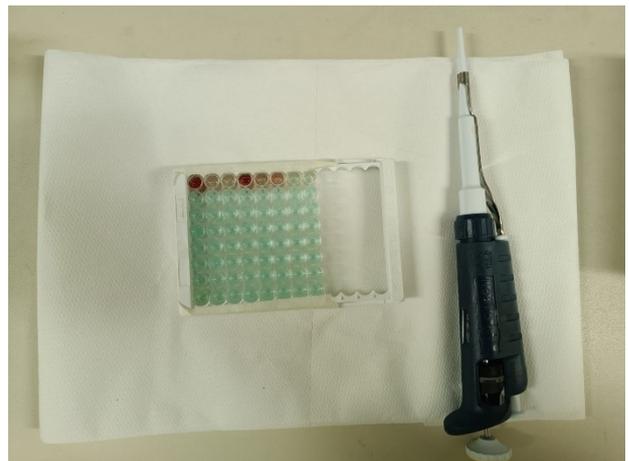


Figura 21. Piastra in cui è stata aggiunta la soluzione di diluizione 2. Il colore dei pozzetti è virato all'azzurro. La prima fila è già stata inoculata con campioni di siero

Nel frattempo, è stata preparata la Soluzione di lavaggio (1X): dopo essere stata portata a temperatura ambiente ( ed essere stata mescolata per assicurare il completo scioglimento di eventuali cristalli, la Soluzione di lavaggio concentrata (10X) è stata diluita in acqua distillata (es: 30 mL di Soluzione di lavaggio 10X + 270 mL di acqua distillata); per *T. gondii* la Soluzione di lavaggio Concentrata (20X) è stata diluita in acqua distillata (ad esempio 30 mL di soluzione di lavaggio sono stati addizionati a 570 mL di acqua distillata).

Trascorso il tempo della prima incubazione si è proceduto ai lavaggi. Come prima cosa è stata rimossa la soluzione dai pozzetti, che sono stati quindi lavati con 300  $\mu$ L di Soluzione di lavaggio (1X) ciascuno per 3 volte assicurandosi di asciugare bene i pozzetti tra un lavaggio e l'altro ma soprattutto prima dell'aggiunta del coniugato.

Solo per *T. gondii* è stato preparato il coniugato 1X diluendo il Coniugato concentrato 10X nella "Soluzione di diluizione 3" in rapporto 1:10.

Per entrambi sono stati quindi aggiunti 100  $\mu$ L di coniugato 1X (il kit di *N. caninum* forniva il Coniugato già della giusta concentrazione) in ciascun pozzetto e le piastre sono state coperte di carta di alluminio e nuovamente incubate in ambiente umido per 1 ora ( $\pm$  5 min) a + 37° C ( $\pm$  3° C) per *N. caninum* e 30 min ( $\pm$  3 min) a temperatura ambiente per *T. gondii* (Figura 23).

È stata nuovamente rimossa la soluzione, i pozzetti sono stati lavati con 300  $\mu$ L di Soluzione di lavaggio ciascuno per 3 volte, il liquido in eccesso è stato rimosso e i pozzetti asciugati per bene.

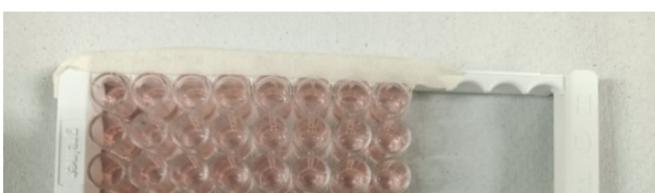
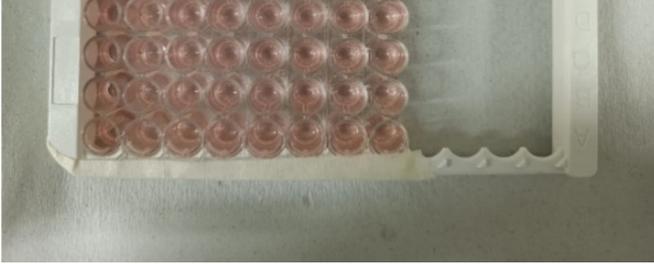


Figura 23. Aspetto della piastra in seguito all'aggiunta del Coniugato diluito nella Soluzione di diluizione 3



Sono stati poi aggiunti 100  $\mu$ L di Soluzione substrato TMB in ciascun pozzetto. Le piastre sono state lasciate incubare al buio, poiché la luce inibisce la reazione, a T ambiente per 15min ( $\pm$  1min) sia per *N. canium* che per *T. gondii*. Nel caso in cui la reazione risultasse essere positiva (presenza degli anticorpi ricercati) il substrato verrà utilizzato dall'enzima legato all'anticorpo e visivamente si vedrà un viraggio di colore (blu). L'intensità della colorazione è proporzionale alla quantità di enzima presente e dunque alla concentrazione dell'anticorpo ricercato (Figura 24).

Trascorso il periodo di incubazione sono stati aggiunti 100  $\mu$ L di Soluzione bloccaggio in ciascun pozzetto per bloccare la reazione. In seguito all'aggiunta di questa soluzione il colore delle piastre diventa giallo paglierino (Figura 25).

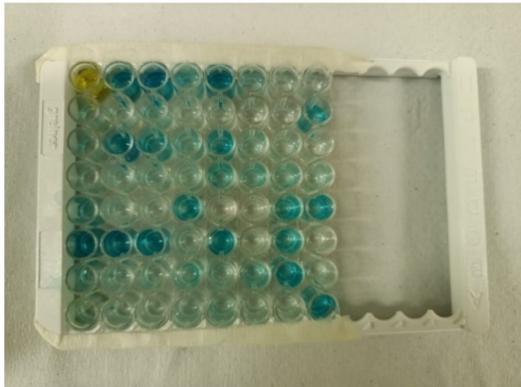


Figura 24. Aspetto della piastra dopo l'aggiunta della Soluzione substrato e dopo il relativo tempo di incubazione

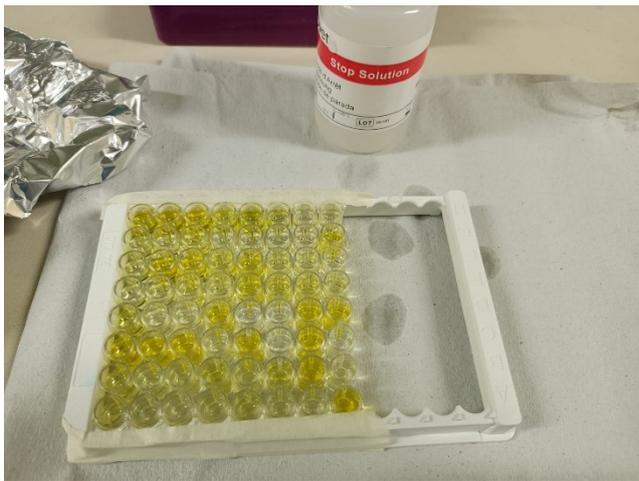


Figura 25. Aspetto della piastra dopo l'aggiunta della soluzione bloccaggio

I risultati sono stati letti e registrati da uno spettrofotometro a 450 nm (Figura 26 e Figura 27). Lo spettrofotometro restituisce i risultati sotto forma di documento Excel e, mantenendo l'ordine dei campioni nelle piastre come tabella, fornisce un valore numerico per ogni campione analizzato. Tale valore è l'OD o indice di densità ottica (più avanti nominato come "Sample A (450)") che va analizzato tramite il calcolo indicato nel kit di riferimento. Il valore numerico finale che si ottiene tramite il calcolo fornito dal kit Elisa va interpretato in base agli intervalli indicati nel medesimo kit, i quali offrono le seguenti possibili interpretazioni: campione positivo; campione dubbio, campione negativo.

Di seguito vengono riportati i calcoli svolti per l'ottenimento del valore dei controlli, del valore dei campioni, l'intervallo di validità dei controlli e i criteri di interpretazione dei risultati ottenuti.





*Figura 26. Piastra prima della lettura nello spettrofotometro*



*Figura 27. Spettrofotometro*

Al fine di validare il test è stato necessario analizzare i controlli forniti dal kit IDEXX come segue:

➤ Calcolo per l'analisi dei controlli negativi:  $NC\acute{x} = \frac{NC\ 1\ A(450) + NC\ 2\ A(450)}{2}$

➤ Calcoli per l'analisi dei controlli positivi:  $PC\acute{x} = \frac{PC\ 1\ A(450) + PC\ 2\ A(450)}{2}$

➤ Calcolo per l'analisi dei campioni:  $S/P\ \% = 100 \times \frac{SampleA(450) - NC\acute{x}}{PC\acute{x} - NC\acute{x}}$

Intervalli di validità per *N. caninum*: il test è valido se tutte le seguenti condizioni vengono rispettate

- $NC\acute{x} \leq 0,500$
- $PC\acute{x} \leq 2,000$
- $PC\acute{x} - NC\acute{x} \geq 0,300$

Dove "NC $\acute{x}$ " è il valore medio di densità ottica dei controlli negativi; "PC $\acute{x}$ " è il valore medio di densità ottica dei controlli positivi e "PC $\acute{x}$  - NC $\acute{x}$ " è la differenza tra il valore medio di densità ottica dei controlli positivi e il valore medio di densità ottica dei controlli negativi.

Intervalli di validità per *T. gondii*: il test è valido se tutte le seguenti condizioni vengono rispettate

- $DO_{cp} > 0,350$
- $\frac{DO_{cp}}{DO_{cn}} > 3$

Dove "DO $_{cp}$ " è il valore medio di densità ottica dei controlli positivi e  $\frac{DO_{cp}}{DO_{cn}}$  è il rapporto tra il valore medio dei controlli positivi e il valore medio dei controlli negativi

Interpretazione dei risultati per *N. caninum*:

$S/P \% < 30 \rightarrow$  negativo

$30 \leq S/P \% < 40 \rightarrow$  dubbio

$S/P \% \geq 40 \rightarrow$  positivo

Interpretazione dei risultati per *T. gondii*:

$S/P \% \leq 40 \rightarrow$  negativo

$40 < S/P \% < 50 \rightarrow$  dubbio

$S/P \% \geq 50 \rightarrow$  positivo

## 3.2 Risultati

### 3.2.1 Distribuzione geografica

È stato possibile creare dei sottogruppi all'interno della popolazione ovicaprina analizzata in base alla provincia di provenienza dei vari campioni, come mostrato nel seguente grafico (Figura 28).

Come si evince, la provenienza dei campioni non è uniforme tra le varie province analizzate. La maggior parte dei campioni sono stati prelevati nelle province di Ravenna (RA) (47%) Forlì-Cesena (FC) (22%) e Rimini (RN) (20%). Le restanti regioni rappresentano meno del 5% del totale degli ovicaprini analizzati.

Delle tre province più rappresentate, da Ravenna (RA) e da Rimini (RN) abbiamo analizzato solo campioni di ovini (100% dei soggetti testati) mentre da Forlì-Cesena arrivano per il 75% campioni da caprini e per il restante 25% da ovini.

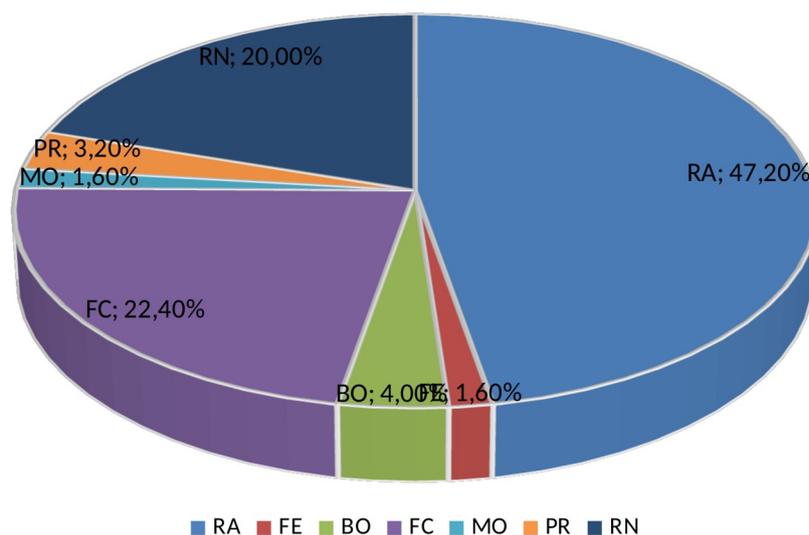


Figura 28. Provenienza dei campioni analizzati distribuita per province.

### 3.2.2 Analisi sierologica

#### *Neospora caninum*

I risultati restituiti dallo spettrofotometro sono stati analizzati, tramite la funzione “PIÙ.SE” del programma Excel, tali risultati sono stati suddivisi, rispettando gli intervalli forniti dal test IDEXX, in tre classi: positivi, dubbi, negativi. I risultati ottenuti sono riportati nella seguente tabella (Tabella 6), che divide i dati per provenienza dei campioni e per specie.

Tabella 6: campioni positivi e dubbi a *N. caninum*

Allevamento	Specie	N°analizzati/ tot gruppo	Riferimento campione	Tot positivi <i>N. caninum</i>	Tot DUBBI <i>N. caninum</i>
Riolo Terme (RA)	Ovini	14/14	039147	0	0
Faenza (RA)	Ovini	12/12	35650	2	1
Faenza (RA)	Ovini	6/6	033982	1	1
Faenza (RA)	Ovini	19/19	033981	0	0
Brisighella (RA)	Ovini	3/3	37273	0	0
Ravenna (RA)	Ovini	3/6	484487	0	0
Ravenna (RA)	Ovini	2/2	33748	0	0
Poggio Renatico (FE)	Caprino	1/1	41198	0	0
Poggio Renatico (FE)	Caprino	1/1	39725	0	0
Anzola dell'Emilia (BO)	Caprini	1/1	51696	0	0
San Pietro in Casale (BO)	Ovini	3/5	36465	0	0
Sasso Marconi (BO)	Caprino	1/1	42639	0	0
Cesena (FC)	Caprini	3/3	39385	3	0
Forlì (FC)	Caprini	1/1	039992	0	0
Forlì (FC)	Caprini	1/1	049945	0	0
Forlì (FC)	Caprini	3/7	044953	0	0
Forlì (FC)	Ovini	7/14	42514	0	0
Civitella di Romagna (FC)	Caprini	8/9	34177	0	0
Civitella di Romagna (FC)	Caprini	2/2	049507	0	0
Savignano sul Rubicone (FC)	Caprini	3/3	34344	0	0
Modena (MO)	Ovini	2/2	47876	0	1
Neviano degli Arduini (PR)	Ovini	2/2	50277	0	0
Neviano degli Arduini (PR)	Ovini	2/4	50287	0	0
Rimini (RN)	Ovini	25/96	45593	0	0
<b>Totale: 24 allevamenti</b>	<b>125 capi</b>			<b>6 positivi</b>	<b>3 dubbi</b>

Tramite questa suddivisione è stato possibile calcolare la sieroprevalenza di *N. caninum* e dividere gli animali presi in considerazione in questo studio in sottopopolazioni in base alla provincia di provenienza dei capi.

Questo studio ha individuato una sieroprevalenza di anticorpi anti- *N. caninum* del 4,8% (vedi Figura 29) nella popolazione di ovi-caprini della regione Emilia-Romagna. Su 125 soggetti analizzati tra ovini (100 soggetti) e caprini (25 soggetti), 6 soggetti sono risultati positivi al test

(rispettivamente 3 ovini e 3 caprini). È stata riscontrata una sieroprevalenza nella popolazione ovina e in quella caprina rispettivamente del 3% e del 12% (vedi Figura 30 e Figura 31).

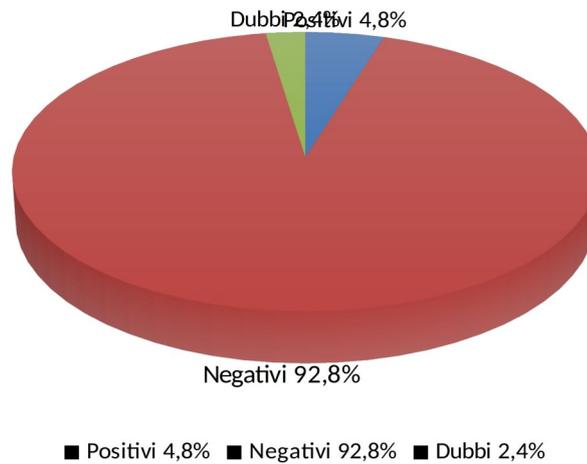


Figura 29. Distribuzione della percentuale di campioni positivi, dubbi e negativi al test IDEXX Ab per la ricerca di anticorpi di *N. caninum* nei campioni di siero analizzati.

Inoltre, è stato riscontrato almeno 1 soggetto positivo nel 12,5% degli allevamenti testati, ovvero su 24 allevamenti 3 ospitano almeno 1 soggetto positivo. Per quanto riguarda la popolazione ovina, è stato individuato almeno 1 soggetto positivo nel 15,4% degli allevamenti testati (2 allevamenti ovini positivi su 13); in quella caprina la percentuale di allevamenti in cui è stato riscontrato almeno 1 soggetto positivo è del 9,1% (1 allevamento caprino positivo su 11).

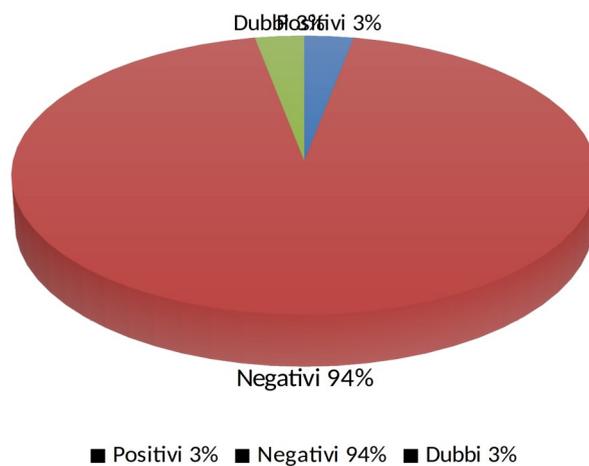


Figura 30. Distribuzione della percentuale di campioni positivi, dubbi e negativi al test IDEXX Ab per la ricerca di anticorpi di *N. caninum* nella popolazione ovina.

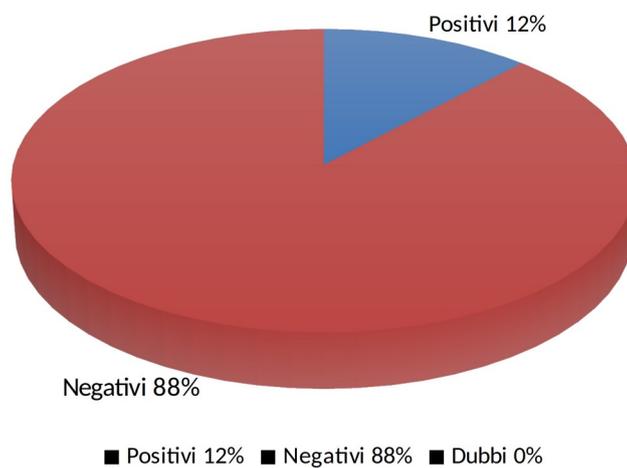


Figura 31. Distribuzione della percentuale di campioni positivi, dubbi e negativi al test IDEXX Ab per la ricerca di anticorpi di *N. caninum* nella popolazione caprina.

## ***Toxoplasma gondii***

Anche in questo caso, i risultati restituiti dallo spettrofotometro sono stati analizzati e con la funzione "PIÙ.SE" del programma Excel e suddivisi, rispettando gli intervalli forniti dal test IDEXX, in tre classi: positivi, dubbi, negativi. I risultati ottenuti dall'analisi sierologica sono riportati nella seguente (Tabella 7), che divide i dati per provenienza dei campioni e per specie.

Tabella 7: campioni positivi e dubbi a *T. gondii*

<b>Allevamento</b>	<b>Specie</b>	<b>N°analizzati/ tot gruppo</b>	<b>Riferimento campione</b>	<b>Tot positivi <i>T. gondii</i></b>	<b>Tot DUBBI <i>T. gondii</i></b>
Riolo Terme (RA)	Ovini	14/14	039147	4	0
Faenza (RA)	Ovini	12/12	35650	7	0
Faenza (RA)	Ovini	6/6	033982	4	0
Faenza (RA)	Ovini	19/19	033981	1	1
Brisighella (RA)	Ovini	3/3	37273	0	0
Ravenna (RA)	Ovini	3/6	484487	3	0
Ravenna (RA)	Ovini	2/2	33748	0	1
Poggio Renatico (FE)	Caprino	1/1	41198	0	0
Poggio Renatico (FE)	Caprino	1/1	39725	0	0
Anzola dell'Emilia (BO)	Caprini	1/1	51696	0	0
San Pietro in Casale (BO)	Ovini	3/5	36465	1	0
Sasso Marconi (BO)	Caprino	1/1	42639	1	0
Cesena (FC)	Caprini	3/3	39385	0	0
Forlì (FC)	Caprini	1/1	039992	0	0
Forlì (FC)	Caprini	1/1	049945	0	0
Forlì (FC)	Caprini	3/7	044953	0	0
Forlì (FC)	Ovini	7/14	42514	2	0
Civitella di Romagna (FC)	Caprini	8/9	34177	0	0
Civitella di Romagna (FC)	Caprini	2/2	049507	0	0
Savignano sul Rubicone (FC)	Ovini	3/3	33748	0	1
Modena (MO)	Ovini	2/2	47876	0	1
Neviano degli Arduini (PR)	Ovini	2/2	50277	2	0
Neviano degli Arduini (PR)	Ovini	2/4	50287	0	0
Rimini (RN)	Ovini	25/96	45593	15	2
<b>Totale: 24 allevamenti</b>	125 capi			40 positivi	4 dubbi

Da questa suddivisione è stato possibile calcolare la sieroprevalenza di *T. gondii* negli allevamenti testati.

Questo studio ha individuato una sieroprevalenza di anticorpi anti- *T. gondii* del 32% (vedi Figura 32) nella popolazione di ovi-caprini della regione Emilia-Romagna. Su un totale di 125 soggetti analizzati tra ovini (100 soggetti) e caprini (25 soggetti), 40 soggetti sono risultati positivi al test, rispettivamente 39 ovini e 1 capra. È stata riscontrata una sieroprevalenza nella popolazione ovina e in quella caprina rispettivamente del 39% e del 4% (vedi Figura 33 e Figura 34).

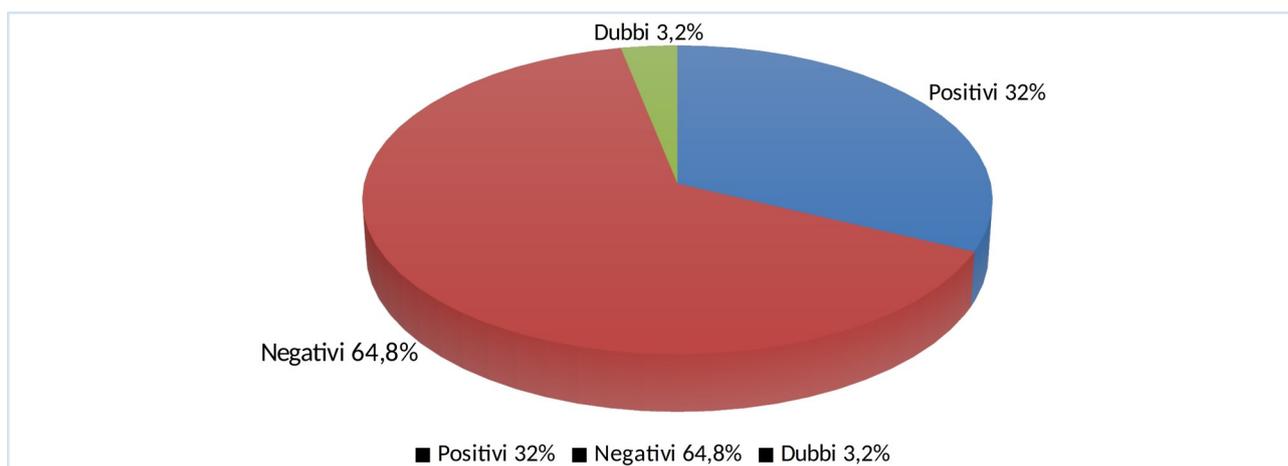


Figura 32. Distribuzione della percentuale di campioni positivi, dubbi e negativi al test IDEXX Toxotest Ab per la ricerca di anticorpi di *T. gondii* nella popolazione ovi-caprina.

Inoltre, è stato riscontrato almeno 1 soggetto positivo nel 41,7 % degli allevamenti testati, ovvero su 24 allevamenti, 10 ospitano almeno 1 soggetto positivo. Per quanto riguarda la popolazione ovina, è stato individuato almeno 1 soggetto positivo nel 69,2% degli allevamenti testati (9 allevamenti ovini positivi su 13); in quella caprina la percentuale di allevamenti in cui è stato riscontrato almeno 1 soggetto positivo è del 9,1% (1 allevamento caprino positivo su 11).

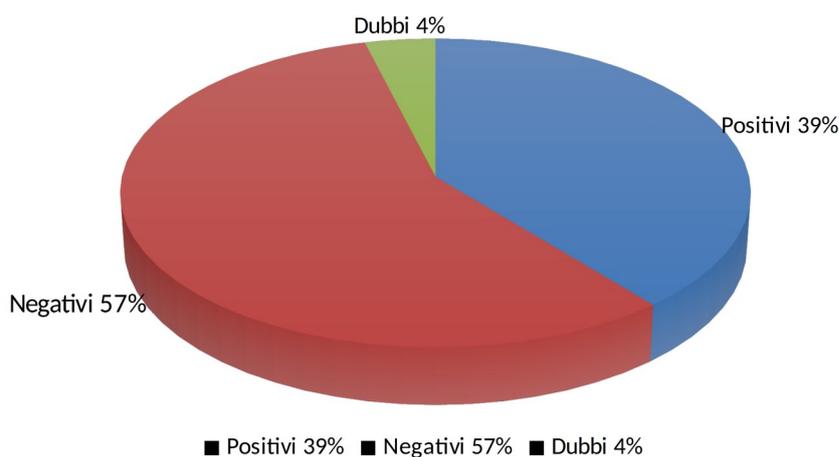


Figura 33. Distribuzione della percentuale di campioni positivi, dubbi e negativi al test IDEXX Toxotest Ab per la ricerca di anticorpi di *T. gondii* nella popolazione ovina.

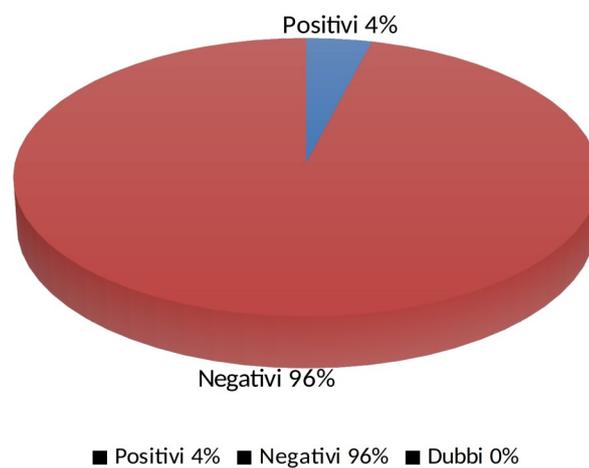


Figura 34. Distribuzione della percentuale di campioni positivi, dubbi e negativi al test IDEXX Toxotest Ab per la ricerca di anticorpi di *T. gondii* nella popolazione caprina.



## 4. DISCUSSIONE

La neosporosi è una patologia che affligge i ruminanti ed è in grado di causare gravi danni economici in allevamento con casi di tempeste di aborti e natimortalità. È ormai diffusa a livello globale e non sono ad oggi disponibili né vaccini efficaci nel prevenire l'aborto né terapie risolutive. La presenza, inoltre, di un ciclo selvatico rende più difficoltoso il controllo delle misure di biosicurezza. Recenti studi dimostrano che finora in ambito ovino è stata sottostimata ma è più presente di quanto si pensi (Benavides et al., 2022). La neosporosi ovina è una malattia emergente a livello globale che potrebbe mettere a rischio la sostenibilità degli allevamenti ovini, soprattutto nei Paesi del Terzo Mondo in cui l'allevamento è quasi completamente basato su ovini e caprini più che su bovini (Benavides et al., 2022). Sebbene la sieroprevalenza globale sia del 15% negli ovini e del 7% nei caprini (Nayeri et al., 2022) essa varia tra paesi e continenti e la percentuale più elevata è registrata in Africa, dove arriva al 20% (Mendoza-Morales et al., 2022).

Il presente studio ha valutato la sieroprevalenza di *N. caninum* nella regione Emilia-Romagna e ne ha stimato un tasso del 4,8% negli ovicaprini. In particolare, il tasso negli ovini risulta essere del 3% e quello nei caprini del 12%. *T. gondii* sembra essere invece molto più diffuso nel medesimo territorio. I valori di sieroprevalenza per *T. gondii* negli stessi capi raggiungono valori del 32%, una percentuale oltre sei volte maggiore rispetto a quella di *N. caninum* ed è risultata molto maggiore negli ovini (39%) rispetto ai caprini (4%).

Confrontando il numero di campioni risultati positivi raggruppati nelle varie province, visibili in Tabella 6, si osserva che gli allevamenti ovini in cui sono state riscontrate delle positività sono due e sono entrambi ubicati a Faenza, nella provincia di Ravenna (RA). I soggetti positivi sono tre (vedi Tabella 6). Da entrambi questi allevamenti alcuni dei capi testati hanno riportato un risultato dubbio, ad indicare che potrebbero esserci dei soggetti che stanno sviluppando anticorpi in seguito ad un contatto recente con il parassita. Nelle altre province considerate non sono state trovate positività in ambito ovino. In un allevamento in provincia di Modena (MO), però, è stato trovato un capo risultato dubbio al test ELISA, a indicare una potenziale presenza del parassita in allevamento. Ulteriori indagini in questo allevamento sarebbero interessanti per rivelarne la presenza o scongiurarne l'assenza.

Sarebbe interessante approfondire la conoscenza della sieroprevalenza con ulteriori studi che indaghino una quantità maggiore di allevamenti nelle città meno rappresentate in questo

studio, come si evince dalla Figura 29, in particolare Bologna (4%), Parma (3%), Modena (2%), Ferrara (2%). Sarebbe inoltre utile indagare la sieroprevalenza caprina delle province di Rimini, Parma, Modena e Ravenna, in cui è stata studiata solo la sieroprevalenza negli ovini, e la sieroprevalenza ovina di Ferrara e Forlì-Cesena in cui è stato testato un solo allevamento di pecore di Forlì (si veda Figura 29).

Il tasso di sieroprevalenza di *N. caninum* dell'Emilia-Romagna ottenuto da questo studio risulta essere inferiore rispetto alla sieroprevalenza media italiana riportata da alcuni studi precedenti, che hanno mostrato valori diversi in base alle regioni italiane di provenienza, rispettivamente: 44% in Sardegna (Mendoza-Morales et al., 2022) e 19,22% nell'Italia nordorientale (Mendoza-Morales et al., 2022). Il tasso ottenuto sembrerebbe però in linea con la media stimata nelle Alpi Orobiche, che ammonta al 2,18% (Gaffuri et al., 2006). La diversità del risultato ottenuto in Sardegna rispetto al Nord Italia è spiegabile in parte dalla concentrazione di ovicaprini, che è maggiore in Sardegna rispetto al Nord Italia, dove gli allevamenti ovicaprini sono meno concentrati. Inoltre, la prevalenza di infezione da *N. caninum* in cani randagi tende ad essere molto alta (Yang et al., 2022) e zone geografiche con un alto numero di cani randagi, come la Sardegna, sono a più alto rischio di diffusione del parassita fra gli ovini.

La sieroprevalenza riscontrata nel presente studio risulta essere inferiore anche alla sieroprevalenza media europea, stimata intorno all'8% (Mendoza-Morales et al., 2022) e alla sieroprevalenza media mondiale.

La differenza di valori di sieroprevalenza di questi studi e dei risultati ottenuti dal presente studio è in accordo quanto riportato da Gazzonis et al (2019) che suggeriscono che è possibile individuare la presenza di cluster ad alta sieroprevalenza e cluster a bassa sieroprevalenza, come riportato da. Per esempio, nella regione della Lombardia, confinante con l'Emilia-Romagna, sono state individuate sia aree ad alta sieroprevalenza sia aree a bassa sieroprevalenza, sia per *T. gondii* sia per *N. caninum* (Gazzonis et al., 2019). Un altro studio del 2022 ha individuato un tasso di sieroprevalenza altamente variabile dallo 0% al 67,4%, sia tra i paesi analizzati sia addirittura tra diverse regioni dello stesso paese (Benavides et al., 2022). Con una sieroprevalenza del 4,8%, la Regione Emilia-Romagna non sembra quindi essere uno dei bacini più interessati da *N. caninum* negli ovini.

La sieroprevalenza di *N. caninum* nei caprini dell'Emilia-Romagna risulta essere più alta rispetto a quella degli ovini, 12% contro il 3%. Questo dato è in disaccordo con i risultati di precedenti ricerche che hanno riscontrato essere più diffusa la neosporosi ovina rispetto a

quella caprina. In tali studi le sieroprevalenze ovine e caprine sono state stimate di rispettivamente 15% e 7% a livello globale (Nayeri et al., 2022) e 19,3% e 5,7% nell'Italia nordorientale (Gazzonis et al., 2019). Nonostante il numero di campioni caprini analizzati in questo studio sia molto inferiore rispetto a quello dei campioni ovini (25 contro 100) questo fattore non incide nel calcolo della sieroprevalenza. Se si considera la distribuzione della sieropositività in ambito caprino si nota che i 3 soggetti sieropositivi su 25 soggetti analizzati provengono tutti dal medesimo allevamento. La concentrazione delle sieropositività in un solo allevamento e il fatto che tutti e tre i soggetti analizzati erano positivi fa pensare ad un pattern epidemico. Sarebbe quindi interessante genotipizzare i soggetti di questo allevamento per indagare il genotipo qui presente. Una alta concentrazione del parassita in un solo allevamento lascia ipotizzare la presenza di un nuovo genotipo.

La situazione che si presenta a livello ovino è diversa: i 3 capi sieropositivi appartengono a due allevamenti diversi, con una distribuzione dell'infezione del 15,4% (due allevamenti su 13), ovvero maggiore di quella caprina. Inoltre, non tutti gli animali degli allevamenti in cui è stata riscontrata sieropositività sono risultati sieropositivi, al contrario dei caprini. Sono stati inoltre identificati 3 soggetti con titolo di sieroprevalenza "dubbio": due di questi appartengono ai due allevamenti in cui sono stati ritrovati soggetti positivi, il terzo animale, che ha mostrato un titolo di sieroprevalenza vicino al cut-off superiore (37,3 con cutoff 40), appartiene invece a un allevamento considerato "Neosporosi-free". Il pattern della sieroprevalenza in ambito ovino non è quindi epidemico ma sembra più endemico.

La percentuale di sieropositivi a *T. gondii* è risultata nettamente superiore a quella di *N. caninum* (oltre 6 volte, Figura 30 e Figura 32). Un aspetto interessante di questo studio è che la maggior parte dei soggetti positivi ad uno dei due parassiti non lo è in maniera univoca: solamente due soggetti, entrambi ovini ma appartenenti a due allevamenti differenti, sono risultati infatti sieropositivi ad entrambi i parassiti (Tabella 6 e Tabella 7). Dei 6 campioni risultati positivi a *N. caninum*, 4 non sono risultati positivi a *T. gondii*. Viceversa, dei 39 campioni positivi a *T. gondii*, ben 37 non sono risultati positivi a *N. caninum*. Questa divergenza nelle sieropositività lascia intendere che il margine di errore del test sierologico dato dalla cross-reattività tra *N. caninum* e *T. gondii* non abbia interferito con i risultati ottenuti. L'ipotesi di cross-reattività con *T. gondii* è inoltre alquanto poco probabile per via dell'elevata sensibilità (>95%) e specificità (>97%) del test ELISA utilizzato (Linee guida IZLER, 2017).

Le differenze osservate nella sieroprevalenza tra pecore e capre potrebbero essere associate alle diverse abitudini di pascolo di entrambe le specie di piccoli ruminanti. Poiché le pecore sono pascolatrici che mangiano piante corte vicino al suolo, è più probabile che lo possono ingerire oocisti che contaminano l'erba e il suolo rispetto alle capre che sono principalmente browser e preferiscono foglie, arbusti e viti, il che rappresentano fino al 60% della loro dieta quotidiana (Basso et al., 2022).

## 5. CONCLUSIONI

Scoperto da meno di 40 anni, sono ancora molti gli aspetti sconosciuti del ciclo biologico, della patogenesi e della terapia di *N. caninum*, in particolare negli ovicapriini. Indagare gli aspetti sconosciuti di questo parassita è utile per controllarne la diffusione e prevenirne la comparsa della sintomatologia clinica e delle conseguenti perdite economiche. La produzione di vaccini efficaci sarebbe un'importante svolta per il controllo di *N. caninum*. Essendo la neosporosi una patologia emergente a livello globale è importante non sottovalutare la presenza di *N. caninum* negli allevamenti e la sua diffusione sul territorio, soprattutto nei paesi la cui principale fonte di sostentamento è l'allevamento di ovicapriini. È quindi fondamentale valutare la sua diffusione sul territorio nazionale ed europeo tramite analisi sierologiche e genetiche per ampliare la nostra conoscenza relativa ai genotipi maggiormente presenti sul nostro territorio e nel nostro continente.



## Bibliografia

Araujo, F G, and J S Remington. "Effect of clindamycin on acute and chronic toxoplasmosis in mice." *Antimicrobial agents and chemotherapy* vol. 5,6 (1974): 647-51. doi:10.1128/AAC.5.6.647

Attias, Márcia et al. "The life-cycle of *Toxoplasma gondii* reviewed using animations." *Parasites & vectors* vol. 13,1 588. 23 Nov. 2020, doi:10.1186/s13071-020-04445-z

Baillargeon, Paul, Gilles Fecteau, Julie Paré, Pierre Lamothe, and Roger Sauvé. "Evaluation of the embryo transfer procedure proposed by the International Embryo Transfer Society as a method of controlling vertical transmission of *Neospora caninum* in cattle". *Journal of the American Veterinary Medical Association* 218.11 (2001): 1803-1806. <<https://doi.org/10.2460/javma.2001.218.1803>>

Barr, B C et al. "Neospora-like protozoal infections associated with abortion in goats." *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* vol. 4,3 (1992): 365-7. doi:10.1177/104063879200400331

Bartels, C J M et al. "Evaluation of three enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to *Neospora caninum* in bulk milk." *Veterinary parasitology* vol. 131,3-4 (2005): 235-46. doi:10.1016/j.vetpar.2005.05.011

Basso, Walter et al. "*Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in sheep and goats in Switzerland: Seroprevalence and occurrence in aborted fetuses." *Food and waterborne parasitology* vol. 28 e00176. 17 Aug. 2022, doi:10.1016/j.fawpar.2022.e00176

Baszler, T V et al. "Detection by PCR of *Neospora caninum* in fetal tissues from spontaneous bovine abortions." *Journal of clinical microbiology* vol. 37,12 (1999): 4059-64. doi:10.1128/JCM.37.12.4059-4064.1999

Battisti, Elena et al. "Circulating genotypes of *Toxoplasma gondii* in Northwestern Italy." *Veterinary parasitology* vol. 253 (2018): 43-47. doi:10.1016/j.vetpar.2018.02.023

Benavides, J et al. "Ovine Toxoplasmosis: A New Look at its Pathogenesis." *Journal of comparative pathology* vol. 157,1 (2017): 34-38. doi:10.1016/j.jcpa.2017.04.003

Benavides, Julio et al. "Ovine Neosporosis: The Current Global Situation." *Animals: an open access journal from MDPI* vol. 12,16 2074. 15 Aug. 2022, doi:10.3390/ani12162074

Bjerkås, I et al. "Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs." *Zeitschrift für Parasitenkunde (Berlin, Germany)* vol. 70,2 (1984): 271-4. doi:10.1007/BF00942230

Bjerkås, I, and J P Dubey. "Evidence that Neospora caninum is identical to the Toxoplasma-like parasite of Norwegian dogs." *Acta veterinaria Scandinavica* vol. 32,3 (1991): 407-10. doi:10.1186/BF03546972

Björkman C, Johansson O, Stenlund S, Holmdahl OJ, Uggla A. Neospora species infection in a herd of dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc.* 1996 May; 208(9) 1441-1444. PMID: 8635995.

Blewett, D A et al. "Response of immune and susceptible ewes to infection with Toxoplasma gondii." *The Veterinary record* vol. 111,9 (1982): 175-8. doi:10.1136/vr.111.9.175

Brindley, P J et al. "Differentiation of Toxoplasma gondii from closely related coccidia by riboprint analysis and a surface antigen gene polymerase chain reaction." *The American journal of tropical medicine and hygiene* vol. 48,3 (1993): 447-56. doi:10.4269/ajtmh.1993.48.447

Buxton, D, and E A Innes. "A commercial vaccine for ovine toxoplasmosis." *Parasitology* vol. 110 Suppl (1995): S11-6. doi:10.1017/s003118200000144x

Buxton, David et al. "The comparative pathogenesis of neosporosis." *Trends in parasitology* vol. 18,12 (2002): 546-52. doi:10.1016/s1471-4922(02)02414-5

Capelli, Gioia et al. "Sero-epidemiological survey of Neospora caninum infection in dogs in north-eastern Italy." *Veterinary parasitology* vol. 123,3-4 (2004): 143-8. doi:10.1016/j.vetpar.2004.06.012

Chryssafidis, Andreas Lazaros et al. "Pathogenicity of Nc-Bahia and Nc-1 strains of Neospora caninum in experimentally infected cows and buffaloes in early pregnancy." *Parasitology research* vol. 113,4 (2014): 1521-8. doi:10.1007/s00436-014-3796-x

Conrad, P A et al. "Transmission of Toxoplasma: clues from the study of sea otters as sentinels of Toxoplasma gondii flow into the marine environment." *International journal for parasitology* vol. 35,11-12 (2005): 1155-68. doi:10.1016/j.ijpara.2005.07.002

de Ory, F et al. "Application of fluoroimmunoassay to the identification of low avidity specific IgG against pathogenic human viruses and *Toxoplasma gondii*." *Clinical and diagnostic virology* vol. 3,4 (1995): 323-32. doi:10.1016/0928-0197(94)00045-v

Desmonts, G, and J Couvreur. "Congenital toxoplasmosis. A prospective study of 378 pregnancies." *The New England journal of medicine* vol. 290,20 (1974): 1110-6. doi:10.1056/NEJM197405162902003

Dijkstra, Th et al. "Evaluation of a single serological screening of dairy herds for *Neospora caninum* antibodies." *Veterinary parasitology* vol. 110,3-4 (2003): 161-9. doi:10.1016/s0304-4017(02)00323-0

Dubey, J P et al. "Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission." *Journal of the American Veterinary Medical Association* vol. 193,10 (1988): 1259-63

Dubey, J. P., et al. "Newly recognized fatal protozoan disease of dogs." *Journal of the American Veterinary Medical Association* 192.9 (1988): 1269-1285

Dubey, J P, and D S Lindsay. "Neospora caninum induced abortion in sheep." *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* vol. 2,3 (1990): 230-3. doi:10.1177/104063879000200316

Dubey, J P, and M L Porterfield. "Neospora caninum (Apicomplexa) in an aborted equine fetus." *The Journal of parasitology* vol. 76,5 (1990): 732-4.

Dubey, J P, and D S Lindsay. "A review of *Neospora caninum* and neosporosis." *Veterinary parasitology* vol. 67,1-2 (1996): 1-59. doi:10.1016/s0304-4017(96)01035-7

Dubey, J P. "Neosporosis--the first decade of research." *International journal for parasitology* vol. 29,10 (1999): 1485-8. doi:10.1016/s0020-7519(99)00134-4

Dubey, J P et al. "Biologic, morphologic, and molecular characterisation of *Neospora caninum* isolates from littermate dogs." *International journal for parasitology* vol. 34,10 (2004): 1157-67. doi:10.1016/j.ijpara.2004.07.005

Dubey, J P et al. "Prevalence of viable *Toxoplasma gondii* in beef, chicken, and pork from retail meat stores in the United States: risk assessment to consumers." *The Journal of parasitology* vol. 91,5 (2005): 1082-93. doi:10.1645/GE-683.1

Dubey, J P, and G Schares. "Diagnosis of bovine neosporosis." *Veterinary parasitology* vol. 140,1-2 (2006): 1-34. doi:10.1016/j.vetpar.2006.03.035

Dubey, J P et al. "Pathogenesis of bovine neosporosis." *Journal of comparative pathology* vol. 134,4 (2006): 267-89. doi:10.1016/j.jcpa.2005.11.004

Dubey, J P et al. "Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*." *Clinical microbiology reviews* vol. 20,2 (2007): 323-67. doi:10.1128/CMR.00031-06

Dubey, Jitender P. "The history of *Toxoplasma gondii*--the first 100 years." *The Journal of eukaryotic microbiology* vol. 55,6 (2008): 467-75. doi:10.1111/j.1550-7408.2008.00345.x

Dubey, J P et al. "High prevalence and genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from goats, from a retail meat store, destined for human consumption in the USA." *International journal for parasitology* vol. 41,8 (2011): 827-33. doi:10.1016/j.ijpara.2011.03.006

Dubey, J.P.; Hemphill, A.; Calero-Bernal, R.; Schares, G. *Neosporosis in Animals*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2017; pp. 1-529 (2017).

El-Alfy, El-Sayed et al. "Genetic characterization of *Neospora caninum* from aborted bovine fetuses in Hokkaido, Japan." *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* vol. 92 (2021): 104838. doi:10.1016/j.meegid.2021.104838

Frenkel, J K et al. "*Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts." *Science (New York, N.Y.)* vol. 167,3919 (1970): 893-6. doi:10.1126/science.167.3919.893

García-Sánchez, Marta et al. "Isolation and genetic characterization of *Neospora caninum* from naturally infected sheep." *Veterinary parasitology* vol. 280 (2020): 109091. doi:10.1016/j.vetpar.2020.109091

Gazzonis, Alessia et al. "Spatial Analysis of Infections by *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa) in Small Ruminants in Northern Italy." *Animals: an open access journal from MDPI* vol. 9,11 916. 4 Nov. 2019, doi:10.3390/ani9110916

González-Warleta, Marta et al. "Neospora caninum infection as a cause of reproductive failure in a sheep flock." *Veterinary research* vol. 45,1 88. 26 Aug. 2014, doi:10.1186/s13567-014-0088-5

Goodswen, Stephen J et al. "A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: from the past to the present." *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* vol. 13 (2013): 133-50.

Guido, Stefano et al. "Serology-Based Diagnostics for the Control of Bovine Neosporosis." *Trends in parasitology* vol. 32,2 (2016): 131-143. doi:10.1016/j.pt.2015.11.014

Halos, Lénaïg et al. "An innovative survey underlining the significant level of contamination by *Toxoplasma gondii* of ovine meat consumed in France." *International journal for parasitology* vol. 40,2 (2010): 193-200. doi:10.1016/j.ijpara.2009.06.009

Hampton, Marissa Martinez. "Congenital Toxoplasmosis: A Review." *Neonatal network: NN* vol. 34,5 (2015): 274-8. doi:10.1891/0730-0832.34.5.274

Hartley, W J, and W F Blakemore. "An unidentified sporozoan encephalomyelitis in sheep." *Veterinary pathology* vol. 11,1 (1974): 1-12. doi:10.1177/030098587401100101

Hill, Dolores E et al. "Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals." *Animal health research reviews* vol. 6,1 (2005): 41-61. doi:10.1079/ahr2005100

Holmdahl, O J et al. "The phylogeny of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* based on ribosomal RNA sequences." *FEMS microbiology letters* vol. 119,1-2 (1994): 187-92. doi:10.1111/j.1574-6968.1994.tb06887.x

Holmdahl, J et al. "Bovine *Neospora* and *Neospora caninum*: One and the same." *Parasitology today (Personal ed.)* vol. 13,1 (1997): 40-1. doi:10.1016/s0169-4758(97)81616-x

Horcajo, P et al. "Vaccines for bovine neosporosis: current status and key aspects for development." *Parasite immunology* vol. 38,12 (2016): 709-723. doi:10.1111/pim.12342

Innes, E A et al. "Neosporosis. Aspects of epidemiology and host immune response." *Annals of the New York Academy of Sciences* vol. 916 (2000): 93-101. doi:10.1111/j.1749-6632.2000.tb05278.x

Innes, E A et al. "Protection against vertical transmission in bovine neosporosis." *International journal for parasitology* vol. 31,13 (2001): 1523-34. doi:10.1016/s0020-7519(01)00284-3

Innes, Elisabeth A et al. "Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination." *Trends in parasitology* vol. 18,11 (2002): 497-504. doi:10.1016/s1471-4922(02)02372-3

Innes, Elisabeth A et al. "Ovine toxoplasmosis." *Parasitology* vol. 136,14 (2009): 1887-94. doi:10.1017/S0031182009991636

Jones, Jeffrey L, and J P Dubey. "Foodborne toxoplasmosis." *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* vol. 55,6 (2012): 845-51. doi:10.1093/cid/cis508

Koyama, T et al. "Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a pregnant sheep." *The Journal of parasitology* vol. 87,6 (2001): 1486-8. doi:10.1645/0022-3395(2001)087[1486:IONCFT]2.0.CO;2

Lindsay, D S, and J P Dubey. "Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections." *American journal of veterinary research* vol. 50,11 (1989): 1981-3

Lindsay, D S et al. "Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*." *Veterinary parasitology* vol. 82,4 (1999): 327-33. doi:10.1016/s0304-4017(99)00054-0

Lindsay, David S, and J P Dubey. "Neosporosis, Toxoplasmosis, and Sarcocystosis in Ruminants: An Update." *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice* vol. 36,1 (2020): 205-222. doi:10.1016/j.cvfa.2019.11.004

Liu, Quan et al. "Diagnosis of toxoplasmosis and typing of *Toxoplasma gondii*." *Parasites & vectors* vol. 8 292. 28 May. 2015, doi:10.1186/s13071-015-0902-6

Lyon, Cecily. "Update on the diagnosis and management of *Neospora caninum* infections in dogs." *Topics in companion animal medicine* vol. 25,3 (2010): 170-5. doi:10.1053/j.tcam.2010.07.005

Maeda, Yousuke et al. "Effect of progesterone on Th1/Th2/Th17 and regulatory T cell-related genes in peripheral blood mononuclear cells during pregnancy in cows." *Veterinary research communications* vol. 37,1 (2013): 43-9. doi:10.1007/s11259-012-9545-7

Marsh, A E et al. "Differentiation of *Neospora hughesi* from *Neospora caninum* based on their immunodominant surface antigen, SAG1 and SRS2." *International journal for parasitology* vol. 29,10 (1999): 1575-82. doi:10.1016/s0020-7519(99)00120-4

McAllister, M M et al. "Evidence suggesting a point source exposure in an outbreak of bovine abortion due to neosporosis." *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* vol. 8,3 (1996): 355-7.

McAllister, M M et al. "Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*." *International journal for parasitology* vol. 28,9 (1998): 1473-8.

McAllister, Milton M. "Diagnosis and Control of Bovine Neosporosis." *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice* vol. 32,2 (2016): 443-63. doi:10.1016/j.cvfa.2016.01.012

Mendoza-Morales, Luisa F et al. "Neosporosis in sheep: A systematic review and meta-analysis of global seroprevalence and related risk factors." *Acta tropica* vol. 233 (2022): 106569. doi:10.1016/j.actatropica.2022.106569

Mirza Alizadeh, Adel et al. "A review on inactivation methods of *Toxoplasma gondii* in foods." *Pathogens and global health* vol. 112,6 (2018): 306-319. doi:10.1080/20477724.2018.1514137

Montoya, J G, and O Liesenfeld. "Toxoplasmosis." *Lancet (London, England)* vol. 363,9425 (2004): 1965-76. doi:10.1016/S0140-6736(04)16412-X

Moreno, B et al. "Occurrence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infections in ovine and caprine abortions." *Veterinary parasitology* vol. 187,1-2 (2012): 312-8. doi:10.1016/j.vetpar.2011.12.034

Nayeri, Tooran et al. "The Global Prevalence of *Neospora caninum* Infection in Sheep and Goats That Had an Abortion and Aborted Fetuses: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Frontiers in veterinary science* vol. 9 870904. 26 Apr. 2022, doi:10.3389/fvets.2022.870904

Ortega-Mora, Luis Miguel et al. "Detection of *Neospora caninum* in semen of bulls." *Veterinary parasitology* vol. 117,4 (2003): 301-8. doi:10.1016/j.vetpar.2003.09.015

Osoro, K et al. "Natural breeding with bulls experimentally infected with *Neospora caninum* failed to induce seroconversion in dams." *Theriogenology* vol. 71,4 (2009): 639-42. doi:10.1016/j.theriogenology.2008.09.035

Oura, C A et al. "The inhibitory effect of ovine recombinant interferon-gamma on intracellular replication of *Toxoplasma gondii*." *Parasite immunology* vol. 15,9 (1993): 535-8. doi:10.1111/j.1365-3024.1993.tb00641.x

Pereira, Karen Signori et al. "Transmission of toxoplasmosis (*Toxoplasma gondii*) by foods." *Advances in food and nutrition research* vol. 60 (2010): 1-19. doi:10.1016/S1043-4526(10)60001-0

Piergili Fioretti, D. e Moretti, A., *Parassitologia e Malattie Parassitarie in Medicina Veterinaria*, (Ed.) 2020, Bononia University Press, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 123, 124, 125, 126, 127 pp.

Reichel, Michael P et al. "A live vaccine against *Neospora caninum* abortions in cattle." *Vaccine* vol. 33,11 (2015): 1299-301. doi:10.1016/j.vaccine.2015.01.064

Robert-Gangneux, Florence, and Marie-Laure Dardé. "Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis." *Clinical microbiology reviews* vol. 25,2 (2012): 264-96. doi:10.1128/CMR.05013-11

Rojo-Montejo, Silvia et al. "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." *Veterinary research* vol. 44,1 106. 1 Nov. 2013, doi:10.1186/1297-9716-44-106

Romo-Gallegos, Jesús Manuel et al. "Prevalence and risk factors of *Neospora caninum* infection in ovine flocks of central-western Mexico." *Acta veterinaria Hungarica* vol. 67,1 (2019): 51-59. doi:10.1556/004.2019.006

Rosypal, Alexa C, and David S Lindsay. "The sylvatic cycle of *Neospora caninum*: where do we go from here?." *Trends in parasitology* vol. 21,10 (2005): 439-40. doi:10.1016/j.pt.2005.08.003

Sánchez-Sánchez, Roberto et al. "Dynamics of *Neospora caninum*-Associated Abortions in a Dairy Sheep Flock and Results of a Test-and-Cull Control Programme." *Pathogens (Basel, Switzerland)* vol. 10,11 1518. 20 Nov. 2021, doi:10.3390/pathogens10111518

Schock, A et al. "Genetic and biological diversity among isolates of *Neospora caninum*." *Parasitology* vol. 123,Pt 1 (2001): 13-23. doi:10.1017/s003118200100796x

Taylor, M. A., Coop, R. L. e Wall, R. L., *Veterinary Parasitology*, (Ed.) 2017, Wiley Blackwell, 350, 412, 413, 414, 498, 499, 500 pp

Tenter, A M et al. "Toxoplasma gondii: from animals to humans." *International journal for parasitology* vol. 30,12-13 (2000): 1217-58. doi:10.1016/s0020-7519(00)00124-7

Thilsted, J P, and J P Dubey. "Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle." *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* vol. 1,3 (1989): 205-9. doi:10.1177/104063878900100301

Trees, Alexander J, and Diana J L Williams. "Endogenous and exogenous transplacental infection in Neospora caninum and Toxoplasma gondii." *Trends in parasitology* vol. 21,12 (2005): 558-61. doi:10.1016/j.pt.2005.09.005

Weston, J F et al. "Efficacy of a Neospora caninum killed tachyzoite vaccine in preventing abortion and vertical transmission in dairy cattle." *Preventive veterinary medicine* vol. 103,2-3 (2012): 136-44. doi:10.1016/j.prevetmed.2011.08.010

Williams, D J L et al. "First demonstration of protective immunity against foetopathy in cattle with latent Neospora caninum infection." *International journal for parasitology* vol. 33,10 (2003): 1059-65. doi:10.1016/s0020-7519(03)00143-7

Yang, Jinfang et al. "Toxoplasma gondii and Neospora caninum Infections in Stray Cats and Dogs in the Qinghai-Tibetan Plateau Area, China." *Animals: an open access journal from MDPI* vol. 12,11 1390. 28 May. 2022, doi:10.3390/ani12111390



## Sitografia

<https://www.idexx.it/it/livestock/livestock-tests/ruminant-tests/idexx-neospora-ab-test>

<https://www.idexx.it/it/livestock/livestock-tests/ruminant-tests/idexx-toxotest-ab-test/>

<https://www.idexx.it/files/elisa-technical-guide.pdf>

<https://www.cdc.gov/dpdx/toxoplasmosis/>

[https://parasitology.cvm.ncsu.edu/life\\_cycles/protozoa/neospora\\_all.html](https://parasitology.cvm.ncsu.edu/life_cycles/protozoa/neospora_all.html)

[https://issuu.com/izsvenezie/docs/lg\\_neospora](https://issuu.com/izsvenezie/docs/lg_neospora)