



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute

Corso di Laurea magistrale a ciclo unico in Medicina
Veterinaria

INDAGINE EPIDEMIOLOGICA SULLE PIROPLASMOSSI
BOVINE NELLA ZONA DI TANGA, TANZANIA

Relatore: Dott. Rudi Cassini

Laureanda: Laura Amato
Matricola n. 593047

ANNO ACCADEMICO 2013/2014

INDICE

Indice	1
Riassunto	5
Abstract	7
Parte generale	9
1. Il contesto tanzaniano	9
1.1 Aspetti geopolitici	9
1.2 Il settore zootecnico bovino	10
1.3 La popolazione bovina	11
2. Le piroplasmosi bovine	13
2.1 Aspetti generali	13
2.1.1 Cenni storici	14
2.1.2 Stabilità endemica	15
2.1.3 Ciclo vitale	16
2.2 Theileriosi bovine	18
2.2.1 <i>T. mutans</i>	19
2.2.2 <i>T. taurotragi</i>	19
2.2.3 East Coast fever	20
2.2.3.1 Epidemiologia	21
2.2.3.2 Trasmissione	24
2.2.3.3 Sintomatologia	25
2.2.3.4 Lesioni anatomopatologiche	26
2.2.3.5 Diagnosi	27
2.2.3.6 Diagnosi differenziale	30
2.2.4 Le altre theileriosi da <i>T. parva</i>	32
2.2.4.1 Corridor disease	32
2.2.4.2 January disease	34
2.2.4.3 Theileriosi cerebrale	36
2.3 Babesiosi bovine	37

2.3.1	Eziologia	37
2.3.2	Epidemiologia	38
2.3.3	Trasmissione	41
2.3.4	Segni clinici e lesioni anatomopatologiche di <i>B. bovis</i>	41
2.3.5	Segni clinici e lesioni anatomopatologiche di <i>B. bigemina</i>	42
2.3.6	Diagnosi	43
2.3.7	Diagnosi differenziale	45
2.3.8	Controllo	46
2.3.8.1	Terapia	46
2.3.8.2	Controllo delle zecche	46
2.3.8.3	Immunizzazione	47
3.	I vettori: le zecche	48
3.1	Aspetti generali	48
3.1.1	Ciclo vitale	48
3.1.2	Alimentazione	50
3.1.3	Ricerca dell'ospite	50
3.1.4	Habitat e distribuzione	51
3.2	<i>Rhipicephalus appendiculatus</i>	52
3.2.1	Ciclo vitale	52
3.2.2	Ospiti	53
3.2.3	Distribuzione e habitat	54
3.2.4	Importanza vettoriale	54
3.3	<i>Rhipicephalus decoloratus</i> e <i>Rhipicephalus microplus</i>	55
3.3.1	Ciclo vitale	56
3.3.2	Ospiti	57
3.3.3	Distribuzione e habitat	57
3.3.4	Importanza vettoriale	57
3.3.5	La competizione tra i due vettori	58
4.	Il controllo	60
4.1	Il controllo delle zecche	60
4.1.1	Gli acaricidi	60
4.1.2	Metodi alternativi	62
4.2	Terapia	63
4.3	Profilassi indiretta	64
4.3.1	Vaccino vivo	64
4.3.2	Vaccino ricombinante	68
4.4	Il controllo integrato	69

Parte sperimentale	73
1. Scopo della tesi	73
2. Materiali e metodi	75
2.1 Area e popolazione di studio	75
2.2 Raccolta dei campioni	79
2.3 Analisi di laboratorio	80
2.4 Analisi statistica	83
3. Risultati	84
3.1 Descrizione della realtà zootecnica	84
3.2 Epidemiologia descrittiva	86
3.3 Analisi dei fattori di rischio	91
4. Discussione	94
4.1 Aspetti metodologici	94
4.2 Aspetti epidemiologici	95
4.3 Il controllo integrato nella Missione	99
5. Conclusioni	101
Bibliografia	103
Ringraziamenti	112

RIASSUNTO

In Africa le malattie trasmesse da zecche ("Tick-Borne-Diseases, TBD") sono considerate il maggiore problema tra le malattie animali (Young et al., 1988) e rappresentano un freno per la produzione zootecnica bovina. All'interno delle TBD, babesiosi e theileriosi sono raggruppate sotto il termine di "piroplasmosi", e rappresentano l'oggetto di questo studio. I costi associati a queste malattie comprendono sia le perdite dirette, causate dalla mortalità e dal calo della produttività, sia i costi indiretti, relativi all'uso di acaricidi, all'acquisto di vaccini e di farmaci terapeutici.

In Tanzania sono presenti circa 21 milioni di capi bovini (FAO, 2012). I piccoli allevatori rappresentano uno dei settori più colpiti dalle TBD, e in particolar modo sono minacciati da *Theileria parva*, agente della "East Coast fever" ("ECF"). Solo in questo settore, le perdite annuali dovute alla ECF si aggirano sui 4 milioni di dollari, in una popolazione di circa 190,000 capi bovini (Minjauw and McLeod 2003). Tuttavia, gli sforzi fatti negli scorsi decenni per limitare i danni causati da questa malattia hanno mascherato la diffusione delle altre TBD, meno letali della East Coast fever ma con la potenzialità di causare perdite. Queste malattie stanno via via emergendo negli ultimi anni (Minjauw and McLeod, 2003), anche a causa delle variazioni nella diffusione dei relativi vettori.

L'indagine epidemiologica del presente studio è stata portata avanti tra luglio e settembre 2013 in Tanzania, in due popolazioni campione nella regione di Tanga: quella interna alla Missione dei Padri Passionisti di Zenneti (Muheza) e quella esterna appartenente a piccoli-medi allevatori dei dintorni, nei distretti di Muheza e Korogwe. I campioni di sangue sono stati valutati attraverso l'analisi microscopica (striscio di sangue), biomolecolare (PCR) e sierologica (ELISA). La prevalenza maggiore si è riscontrata alla PCR (27/123; 22,0%), mentre quella microscopica è stata del 11,5% (14/122). L'analisi sierologica, effettuata su di un numero minore di campioni, ha riscontrato una bassa siero prevalenza per tutti i patogeni considerati (10%). La situazione epidemiologica emersa nei confronti delle piroplasmosi

evidenzia una limitata circolazione delle varie specie di piroplasmi riscontrati (*Theileria spp.*, *T. mutans*, *T. velifera*, *T. parva*, *Babesia bovis*) e conseguentemente uno stato di instabilità endemica, in cui gli animali non possiedono immunità nei confronti delle malattie in questione e dunque, quando ne vengono in contatto, si creano gravi perdite economiche. Il contatto con le zecche e i patogeni (*challenge*) è mantenuto basso dal frequente trattamento acaricida messo in pratica, ma questa situazione non è economicamente vantaggiosa e mette a rischio tutti i capi bovini qualora si verificassero delle rotture nel metodo di controllo. Per il futuro, è necessario migliorare l'attuale trattamento o rinforzarlo con altri metodi, per raggiungere quello che si definisce "controllo integrato" e che rappresenta la migliore opzione dal punto di vista economico ed epidemiologico per tutti gli allevamenti della zona.

ABSTRACT

Tick-Borne-Diseases are considered as the main problem regarding animal diseases in Africa (Young et al., 1988). Among the TBD which constraint the bovine production, babesiosis and theileriosis are more commonly known as “piroplasmosis”, and these diseases are the main subject of this thesis. The costs associated with TBDs include both direct losses (from mortality and reduced production), and the costs associated with control and treatment.

Tanzania accounts for 21 million of bovines (FAO, 2012), and the smallholder dairy system suffers the highest losses per animal, with *Theileria parva* (causing ECF) being the major threat. Annual losses caused by ECF in this sector are estimated around 4 million dollars, on a population of 190.000 bovine animals (Minjauw and McLeod 2003). However, efforts presently being made to control *T. parva* are to some extent obscuring the impact of other less lethal TBD, which anyway have the potential to cause substantial losses. These diseases are more and more emerging in the latter years (Minjauw and McLeod 2003) also because of the variation on the vectors diffusion.

The epidemiologic survey of this work was conducted from July to September 2013 in two different bovine populations in region of Tanga, Tanzania: one inside the Zenneti's farm of Passionist Fathers and the other in small-medium dairyfarmers in Muheza e Korogwe district. Blood samples were examined with microscope (Blood smear), biomolecular (PCR) and serological (ELISA) analysis. The highest prevalence was detected with the PCR analysis (27/123; 22,0%), whereas at the microscope examination the prevalence was 11,5% (14/122). Serological analysis, conducted on a smaller sample number, showed a low seroprevalence for all pathogens (10%). The epidemiologic situation regarding piroplasmosis showed a limited circulation of piroplasmic species encountered (*Theileria* spp., *T. mutans*, *T. velifera*, *T. parva*, *Babesia Bovis*) and suggested an endemic instability state: the animals do not have immunity against such diseases, thus causing heavy economic losses whenever they get infected. The contact with ticks and pathogens (challenge) is kept low by the

regular acaricide treatment, but this method is not economically viable and could lead to serious economic losses in case of an acaricide breakdown. In the future, it will be necessary to improve the current treatment or to strengthen it with other methods, in order to reach the so-called “integrated control” which is the best option economically and epidemiologically for all livestock in the area.

PARTE GENERALE

1. IL CONTESTO TANZANIANO

1.1 ASPETTI GEO-POLITICI

La Tanzania è uno Stato dell'Africa orientale, affacciato sull'Oceano Indiano e compreso tra il Kenya e l'Uganda a Nord, Ruanda, Burundi e Congo a Ovest, Zambia, Malawi e Mozambico a Sud. È compresa negli Stati dell'Africa sub-sahariana. L'indipendenza è stata ottenuta nel 1962. Retaggio del periodo coloniale è l'insegnamento dell'inglese nelle scuole secondarie, che è la seconda lingua ufficiale dopo lo Swahili (o Kiswahili).

La Tanzania è tra i paesi più poveri al mondo; il PIL è di 28,25 miliardi di USD (Dato fornito dalla Banca Mondiale: <http://www.google.it/publicdata>) ma l'economia dipende dall'agricoltura. A causa della topografia e delle condizioni climatiche, tuttavia, le terre coltivabili sono solamente il 4% del totale. L'industria è limitata alla lavorazione dei prodotti agricoli e rappresenta una piccola parte del PIL. Le riforme dei vari settori sono bloccate dall'oneroso debito pubblico, che pone un freno allo sviluppo più di quanto non facciano le problematiche climatiche e sociali. Dal punto di vista climatico la Tanzania si trova nella fascia sub-equatoriale ed è caratterizzata da temperature alte tutto l'anno. La piovosità stagionale è molto accentuata e nel corso dell'anno vi sono due stagioni di piogge abbondanti: la stagione delle piccole piogge va da ottobre a dicembre, quella delle grandi piogge da marzo a maggio. Nei mesi intermedi, il clima è caldo e secco, soprattutto tra gennaio e febbraio in cui i 40 gradi centigradi si superano facilmente. La stagionalità

del clima ha da sempre influenzato lo sviluppo dell'agricoltura e delle altre fonti di sostentamento.

Il territorio è di 945.090 Km² e comprende ambienti naturali come le steppe aride della zona centrale, fertili colline coltivate nella zona più a Nord, zone di foresta pluviale alternate a savane erbose. Il Kilimanjaro, al confine con il Kenya, con i suoi 5895 m s.l.m. è la cima più alta del continente. Questa immensa biodiversità viene tutelata all'interno dei Parchi Nazionali, santuari per gli animali selvatici e fonte di guadagno per il Paese, che ricava dal comparto turistico una parte importante del PIL (Ardemagni et al., 2004).

1.2 IL SETTORE ZOOTECNICO BOVINO

La Tanzania possiede circa 21 milioni di capi bovini (FAO, 2012), la seconda maggiore popolazione bovina tra gli Stati dell'Africa sub-sahariana. Il settore zootecnico bovino del paese comprende una varietà di sistemi di allevamento molto diversi tra loro. Questi sistemi sono stati descritti in dettaglio, per il Kenya (Gachohi et al., 2012), ma si può affermare che in Tanzania la produzione si stia attualmente evolvendo in un sistema market-oriented, simile alla situazione keniana.

I principali sistemi di produzione rientrano in tre categorie: sistemi commerciali, sistema dei piccoli produttori di latte e sistemi tradizionali.

I primi consistono in unità di produzione di latte o carne in cui vengono allevati soggetti appartenenti a razze esotiche, molto produttive.

Gli "smallholder dairy" invece sono degli allevatori che possiedono meno di 10 capi da latte e si trovano prevalentemente nelle zone peri-urbane o rurali densamente popolate, in cui il mercato del latte è facilmente accessibile (Minjauw and McLeod, 2003). A causa della scarsa disponibilità di terra in queste zone gli animali sono tenuti in stalle o recinti fissi (zero-grazing), legati o non, e non vengono portati al pascolo. Al contrario, i foraggi freschi sono falciati e portati dalla campagna agli

animali. Per questo sistema di allevamento vengono utilizzati soprattutto incroci o razze esotiche per massimizzare la produzione di latte. Da questi produttori deriva più dell'80% del latte complessivamente prodotto in Tanzania, anche se i valori di produzione raramente superano i 10 l/vacca/giorno(Phiri et al., 2012).

Infine, ai sistemi tradizionali appartengono i sistemi crop-livestock e livestock-dependent. Entrambi sono caratterizzati dalle razze locali, altamente resistenti e che richiedono poche cure. L'allevamento è associato all'agricoltura (crop-livestock) o costituisce l'unica fonte di reddito della famiglia (livestock-dependent) o della tribù, poiché spesso questo è il sistema tipico delle popolazioni nomadi o transumanti che vivono nelle zone più aride del paese(Minjauw and Mcleod, 2003).

1.3 LA POPOLAZIONE BOVINA

La popolazione bovina della Tanzania è composta da due gruppi: gli zebuini (*Bos indicus*, o *Bos primigenius indicus*) ed i taurini (*Bos taurus*, o *Bos primigenius taurus*), due sottospecie di *Bos primigenius*, del genere *Bos*, famiglia Bovidae. Le due sottospecie hanno un ancestrale comune, *Bos primigenius primigenius*, compreso nella stessa specie.

Fanno parte del gruppo degli zebuini le razze locali, originarie dell'Asia e importate in Africa, ma ben adattate alle condizioni climatiche difficili, quali carenza di acqua ed elevate temperature, per le quali hanno sviluppato un'alta resistenza. Inoltre hanno abitudini alimentari "rustiche", sono abituati a pascolare in zone quasi desertiche e non hanno grandi necessità dal punto di vista nutrizionale. Le tipiche pliche cutanee aumentano la superficie disponibile per la dispersione del calore, la gobba sul garrese è composta da riserve adipose, possiedono più ghiandole sudoripare rispetto i taurini e hanno arti lunghi e resistenti, ottimi per le marce forzate della transumanza. Presentano inoltre una buona resistenza alle malattie, frutto di una selezione naturale nel tempo. Il problema maggiore riguarda la

produttività: la produzione giornaliera di latte si aggira sugli 1-2 litri. Queste razze sono specialmente utilizzate nei sistemi di allevamento tradizionali.

Al contrario, la maggiore produzione di latte delle razze importate (*Bos taurus*), dette anche razze "esotiche", attira sia grandi sia piccoli allevatori che cercano di far fronte ad una crescente domanda/mercato di latte. Il problema principale di questi bovini però è la loro scarsissima resistenza alle condizioni climatiche ed alle numerose malattie infettive e parassitarie della zona. Queste malattie determinano un'alta mortalità e il crollo della produzione di latte, che non si ristabilisce più nell'arco di vita dell'animale. Le razze esotiche sono importate grazie a programmi di inseminazione artificiale, promossi dal governo, e sono principalmente razze europee, come Frisona, Pezzata Rossa e Jersey. A questo scopo, in Tanzania esiste dagli anni '90 il NAIC (National Artificial Insemination Centre), ad Arusha, che procura azoto liquido e seme congelato. Il seme costa 2000 TSH (Scellini Tanzaniani) la dose (circa 1 euro).

2.LE PIROPLASMOSI BOVINE

2.1 ASPETTI GENERALI

Il termine “piroplasma” derivava in origine dal fatto che alcuni protozoi parassiti dei globuli rossi, dopo la moltiplicazione intra-eritrocitaria, assumono forma piriforme. Al giorno d’oggi, questo termine è ancora utilizzato per raggruppare un insieme di protozoi causa di malattie nei vertebrati, conosciute come “piroplasmosi”.

Criado-Fornelio et al. (2003) utilizzò il gene 18s rRNA per effettuare delle analisi filogenetiche e propose di suddividere i piroplasmi (o piroplasmidi) in 5 cladi:

1. Babesie degli ungulati (tra cui quindi *B. bovis*, *B. ovis*, *B. caballi*, *B. bigemina*)
2. altre *Babesia* spp. tra cui *B. canis* e *B. divergens*
3. Il gruppo di *B. microti*
4. Theileria-like degli USA occidentali
5. Theilerie vere e proprie (tra cui tutte le specie di *Theileria* dei bovini)

Le Babesie responsabili di malattia nel bovino nelle zone sub-sahariane sono due, *B. bovis* e *B. bigemina*, e si fa riferimento ad entrambe quando si parla di “babesiosi”.

La situazione è invece più complicata per le diverse specie di *Theileria*. La principale malattia causata da questi protozoi è la East Coast Fever, molto diffusa in tutta l’Africa orientale, centrale e meridionale, che è causata dall’agente *T. parva parva*. Esistono tuttavia altre sottospecie di *T. parva* che causano malattie meno diffuse e meno conosciute, come la January Disease, la Corridor Disease. Inoltre, altre Theilerie presenti nella regione sono *T. mutans*, *T. taurotragi* e *T. velifera*, solo sporadicamente patogene ma in grado di complicare l’iter diagnostico per *T. parva*.

2.1.1 CENNI STORICI

La scoperta di *Babesia* spp. avvenne verso la fine del 19° sec., quando Babes ritrovò in Romania dei micro-organismi all'interno di globuli rossi nel sangue di bovini che mostravano segni di ematuria o "red water fever" (Babes, 1888). Meno di un decennio dopo, negli Stati Uniti, fu identificato l'agente della "Texas cattle fever" e Smith e Kilborne (Smith, 1893) dimostrarono per la prima volta la capacità degli artropodi ematofagi di trasmettere un parassita all'interno di un gruppo di mammiferi, e nello specifico tra i bovini attraverso la zecca *Boophilus annulatus*. Lo stesso anno, Starcovici identificò i parassiti osservati, ed altri, come *Babesia bovis*, *Babesia ovis* e *Babesia bigemina*, e fu creato il genere *Babesia* (Starcovici, 1893).

La prima descrizione della theileriosi più importante, la East Coast Fever, risale al lavoro di Gray e Robertson (1902) in cui la malattia è presentata come una forma molto virulenta di babesiosi in Zimbabwe. Il parassita invece fu individuato per la prima volta da Koch (1903), che lo identificò con uno già visto nel 1897 nella regione costiera della Tanzania. Egli chiamò la malattia African Coast Fever, che successivamente divenne East Coast Fever. L'agente eziologico ebbe una serie di nomi prima di giungere a quello attuale: fu battezzato da Uilenberg nel 1976 (Uilenberg, 1976), che lo chiamò *Theileria parva parva* per distinguerlo dalle sottospecie in grado di causare le altre theileriosi.

2.1.2 STABILITÀ ENDEMICA

Si definisce “stabilità endemica” lo stato epidemiologico di una popolazione in cui la manifestazione clinica della malattia è infrequente nonostante alti livelli di infestazione (Coleman et al., 2001). Questa situazione si verifica laddove la frequenza dell'infezione è talmente alta da determinare l'acquisizione di immunità nella maggior parte della popolazione in giovane età, quando la forma clinica della malattia è spesso lieve paragonata alla malattia negli animali adulti. La prevalenza della malattia nelle classi maggiori di età è pertanto ridotta da questi alti livelli di immunità protettiva (Hay, 2001).

Il fattore maggiormente importante affinché si sviluppi una stabilità endemica è dunque la presenza di zecche infette, vettrici di piroplasmi, in numero sufficiente da causare una esposizione alla malattia (per tutti gli animali) in giovane età, e il loro contatto con gli animali. I vitelli infatti possiedono una resistenza naturale alle piroplasmi fino ai primi 6-9 mesi di vita, che esula da quella che può essere l'immunità materna trasmessa attraverso il colostro (Uilenberg, 1995). Se infettati in questo periodo, nella maggior parte dei casi sviluppano una forma subclinica lieve ed una immunità duratura ed efficace per gli anni a venire. In queste condizioni la malattia ha scarso impatto, e si parla di stabilità endemica: la tolleranza si instaura perché tutti o quasi gli animali si infettano in giovane età, manifestano scarsi sintomi clinici, causano minime perdite economiche e restano resistenti all'infezione per il resto della loro vita (Uilenberg, 2006).

Il paradosso di questa situazione è che riducendo la forza dell'infezione, si può andare incontro ad un aumento dei casi clinici (Hay, 2001), che può accadere per via dell'abbondante uso di acaricidi messo in pratica per proteggere gli animali di razza esotica, meno resistenti alle malattie. Questo porta ad una condizione di instabilità endemica: gli animali vengono a contatto con l'agente solo in tarda età e dunque sviluppano la malattia, determinando grosse perdite economiche. Le malattie sono soggette a recrudescenze e causano frequentemente perdite economiche rilevanti.

2.1.3 CICLO VITALE

Il ciclo vitale dei piroplasmi è molto complesso ma può essere suddiviso in tre fasi principali (Vial and Gorenflot, 2006):

1. Gametogonia, una fase sessuale in cui avviene la formazione e fusione dei gameti all'interno dell'addome della zecca vettrice.
2. Sporogonia, fase di riproduzione asessuata negli acini delle ghiandole salivari della zecca.
3. Merogonia, fase di divisione asessuata all'interno degli eritrociti dell'ospite vertebrato.

Tuttavia, esistono alcune differenze tra il ciclo di *Babesia* e di *Theileria* che influenzano la trasmissione e l'epidemiologia delle due malattie.

Per quanto riguarda la fase di sviluppo nell'ospite invertebrato, la zecca si infetta quando effettua un pasto di sangue sull'animale infetto e, insieme al sangue, ne ingerisce anche i piroplasmi (nella forma di merozoiti), i quali si sviluppano in microgameti filiformi e macrogameti globulari. Nell'addome dell'artropode avviene la fusione tra i due, da cui si origina lo zigote (Uilenberg, 2006).

A questo punto, in *Babesia* lo zigote si moltiplica e sviluppa delle forme dette "vermicoli" che invadono diversi organi del vettore, comprese le ovaie. Questo determina la trasmissione transovarica del parassita, che effettuerà la sporogonia nelle ghiandole salivari di larve, ninfe e/o zecche adulte nate da zecche femmine infette. Alcune specie di *Babesia* possono trasmettersi in questo modo per più generazioni anche in assenza di una reinfezione (Uilenberg, 2006).

In *Theileria*, al contrario, lo zigote non va incontro a moltiplicazione ma, avvenuta la muta del vettore, origina una forma dotata di mobilità che migra verso le ghiandole salivari della zecca attraverso l'emolinfa, non coinvolgendo le ovaie ed escludendo pertanto la trasmissione trans-ovarica. Nelle cellule epiteliali salivari iniziano lo sviluppo migliaia di minuscoli sporozoiti durante la prima parte del nuovo pasto di sangue del vettore. L'infezione di *Theileria* è pertanto trans-stadiale, ma è valida solo per una generazione: se la larva si infetta, sarà infetta la ninfa; se si infetta la

ninfa, sarà infetto l'adulto, ma il vettore non mantiene l'infezione dopo averla trasmessa (Uilenberg, 2006).

In entrambi i generi di protozoi, quando la zecca infetta si attacca ad un nuovo ospite ha inizio la maturazione degli sporozoiti, perciò la zecca non potrà trasmettere immediatamente l'infezione ma soltanto dopo un paio di giorni (Uilenberg, 2006). La trasmissione avviene infatti con l'iniezione del parassita attraverso la saliva nella fase di sporozoita nell'ospite vertebrato, ma a questo punto *Babesia* spp e *Theileria* spp seguono un percorso diverso. *Babesia* spp. va ad infettare direttamente i globuli rossi mentre gli sporozoiti di *Theileria* attraversano una fase pre-eritrocitaria, che coinvolge le cellule del sistema immunitario: penetrano prima in linfociti o macrofagi dove diventano schizonti; gli schizonti sviluppano i merozoiti che, a loro volta, entrano negli eritrociti e entrano nella fase di merogonia: nei globuli rossi si sviluppano le cellule figlie, in numero di due per *Babesia* spp e quattro per *Theileria* spp (è tipica la forma a tetrade/croce maltese). Queste forme escono dal primo eritrocita per infettarne altri. La moltiplicazione per gemmazione continua fino alla reazione del sistema immunitario o alla morte dell'animale. L'assenza della fase di schizogonia (prima della merogonia) in *Babesia* spp. aiuta la diagnosi differenziale nei confronti di *Theileria* spp. (Uilenberg, 2006). Per *Babesia* inoltre è dimostrato che una piccola percentuale di merozoiti non si divide ma origina una forma sferica ("gamonti") che rimane all'interno degli eritrociti (Mackenstedt et al., 1990). Questa forma probabilmente serve a trasmettere l'infezione alla nuova zecca attraverso il pasto di sangue, per riprendere il ciclo dalla gametogonia.

2.2 THEILERIOSI BOVINE

Con il termine “theileriosi bovine” si intende un complesso di malattie dei bovini causate da un protozoo parassita trasmesso dalle zecche, appartenente al genere *Theileria*, famiglia *Theileriidae*, ordine *Piroplasmida*, sottoclasse *Piroplasmia* e phylum *Apicomplexa*.

Tra le specie di *Theileria* capaci di infettare il bovino, nelle zone sub-sahariane la più importante è *Theileria parva*. La tassonomia a livello di sottospecie è tutt’ora controversa, poiché gli autori non si trovano d’accordo nel riconoscere tre sottospecie diverse o considerarle una sottospecie unica (Lawrence et al., 1992a). Le sottospecie sono *T. parva parva*, agente della East Coast Fever, *T. parva lawrencei*, causa della Corridor Disease, e *T. parva bovis*, che causa la January Disease. Si attendono delucidazioni dalla caratterizzazione molecolare, recentemente introdotta, per chiarire la situazione.

Altre specie minori riconosciute sono *T. mutans*, *T. taurotragi*, *T. buffeli* e *T. velifera*. Infine, *Theileria annulata* è la responsabile della cosiddetta “theileriosi tropicale”, una malattia del bovino diffusa su scala mondiale ma soprattutto in Nord Africa. Da un punto di vista clinico, la patogenesi è più legata agli aspetti ematologici (piroplasmi intra eritrocitari) rispetto alla East Coast Fever, la cui evoluzione, come si vedrà in seguito, coinvolge principalmente il sistema linfatico (Torr et al., 2002).

2.2.1 THEILERIA MUTANS

Parassita di bovini e bufali africani, è molto diffusa in tutta l’Africa sub-sahariana come lo sono le sue zecche vettrici. È trasmessa infatti da più specie di *Amblyomma*: *A. variegatum*, *A. cohaerens*, *A. gemma*, *A. hebraeum* e *A. astrion*. Paragonata a *T. parva* e *T. annulata*, questa theileriosi risulta essere solo lievemente patogena per i bovini, e infatti è nota anche come “theileriosi benigna”. Tuttavia in Africa orientale sono registrati casi fatali, causati da ceppi particolarmente aggressivi dei quali non si conosce la diffusione (Lawrence et al., 1992f). In questi casi l’anemia e l’ittero si aggravano fino a diventare fatali. *T. mutans* causa perdite di produzione soprattutto quando presente in associazione con altri parassiti trasmessi da zecche o con situazioni di stress causate da scarsa nutrizione o altre infezioni (Torr et al., 2002). Dal momento che di solito si tratta di un parassita benigno, ci sono scarse indicazioni circa trattamenti o metodi di controllo messi in atto in condizioni normali (Lawrence et al., 1992f).

2.2.2 THEILERIA TAUROTRAGI

Theileria taurotragi è patogena nei suoi ospiti classici (pecore, eland e altri selvatici) ma è benigna nei bovini. La sua importanza è relativa alla confusione che può generare nei confronti di *T. parva*: l’infezione da *T. taurotragi* può essere scambiata per una forma lieve di *T. parva* ed entrambe le specie vengono trasmesse dalla zecca *R. appendiculatus*. Inoltre gli anticorpi verso *T. taurotragi* mostrano cross-reattività verso *T. parva* al test IFAT. Il test ELISA, al contrario, non mostra questo problema (Lawrence et al., 1992e).

2.2.3 EAST COAST FEVER

La East Coast fever è una malattia mortale del bovino causata dal protozoo *Theileria parva parva*. È trasmessa dall'artropode *Rhipicephalus appendiculatus*, meglio nota come "zecca marrone dell'orecchio". È diffusa in buona parte dell'Africa orientale, centrale e meridionale, dal momento che è riportata in ben 11 paesi: Burundi, Kenya, Malawi, Mozambico, Ruanda, Sudan, Tanzania, Uganda, Congo, Zambia and Zimbabwe (Lawrence et al., 1992a). In questi paesi, la East Coast fever causa una perdita stimata, per il 1989, di 186 milioni di dollari (Mukhebi et al. 1992).

In Tanzania è la principale causa di mortalità riportata nel bestiame, che si manifesta in particolare nelle razze taurine e loro incroci, insieme ad una grave perdita di performance. Gli allevatori dunque sono scoraggiati dal migliorare i propri capi indigeni per l'aumentare del rischio di contrarre una grave forma della malattia (Kivaria et al., 2007).

Nell'Africa orientale la malattia è endemica da molto tempo. Il parassita probabilmente è originato dal bufalo africano (*Syncerus caffer*) e si è adattato al bovino in un secondo momento. Infatti, a partire dal XIX secolo, gli europei hanno introdotto e movimentato nel continente un gran numero di capi (Lawrence et al., 1992a). Questo ha causato la rottura dell'equilibrio precedentemente affermatosi e la malattia è diventata endemica. Dall'Africa orientale si sarebbe poi diffusa alle zone centrali e meridionali nei primi anni del XX secolo, a causa del trasferimento di molti capi dalla Tanzania a Sud (Dolan, 1999). Una precedente epidemia di Afta Epizootica ("Foot and Mouth Disease") ne aveva infatti decimato la popolazione bovina. Inavvertitamente, insieme agli animali furono introdotti in un ambiente indenne anche il parassita ed il suo vettore. La ECF causò fin da subito gravi perdite e pochi anni dopo la sua scoperta ed identificazione si introdussero composti chimici a base di arsenico per controllarne il vettore. Fino agli anni '70, l'uso di acaricidi di vario genere è stato l'unico metodo di controllo disponibile (Dolan, 1999). Attualmente si sta assistendo ad un progressivo passaggio al "controllo

integrato”, che permette di ridurre notevolmente i costi della malattia. Per questo argomento si rimanda al Capitolo 4 della presente Tesi.

2.2.3.1 EPIDEMIOLOGIA

In Africa meridionale, *T. parva* si mantiene nella popolazione di bufali selvatici all’interno di specifici *game parks*, o si manifesta periodicamente come una forma meno violenta di theileriosi chiamata January Disease, come avviene periodicamente in Zimbabwe. Negli Stati centro-orientali invece la malattia è tuttora molto diffusa (Figura 1). I fattori maggiori di rischio sono l’andamento stagionale del clima e la condivisione del pascolo tra bovini e bufali. In queste zone si mettono in atto strategie per tenere la malattia sotto controllo ma non si è ancora riusciti ad eradicarla (Dolan, 1999).

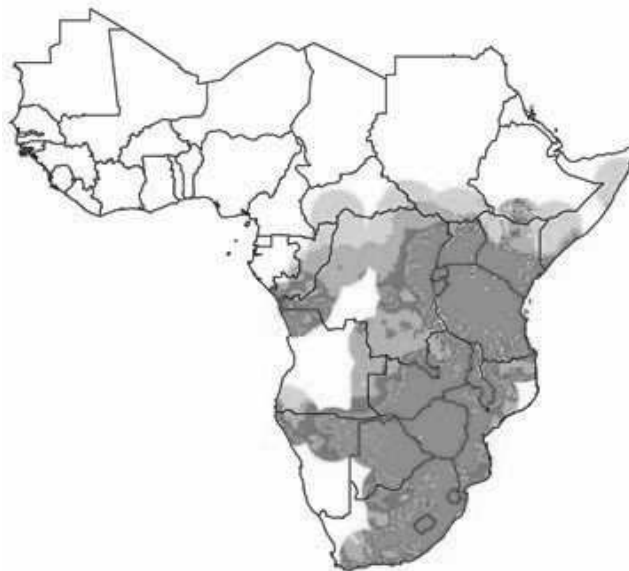


Figura 1 – In grigio le zone a rischio di ECF sulla base della probabilità di presenza del vettore (da Minjaw and Mcleod, 2003)

VETTORE E AMBIENTE: STAGIONALITÀ DELLA MALATTIA

La diffusione della malattia è associata al suo vettore, *Rhipicephalus appendiculatus*, che trova in Tanzania un ambiente idoneo al suo sviluppo. La malattia ha andamento stagionale in determinate zone mentre in altre è presente tutto l'anno, a seconda della stagionalità del clima. Nelle zone costiere infatti si alternano due stagioni secche e due umide e, poiché la zecca è presente simultaneamente in tutti gli stadi, la malattia è sempre presente durante l'anno. Nelle zone più interne e meridionali della Tanzania, al contrario, si verifica una sola stagione delle piogge e durante questa si registrano il maggior numero di casi di ECF, causati dalla maggiore presenza e attività delle zecche adulte durante il periodo umido, che va da gennaio a marzo (Lawrence et al., 1992a).

Questo fatto avviene perché il ciclo vitale di *Rh. appendiculatus* può momentaneamente arrestarsi ed entrare in diapausa al cambiamento dei fattori climatici: la diapausa si manifesta come un blocco dello sviluppo in zecche ingorgate o come una fase di quiescenza in animali che non si sono ancora nutriti (Short and Norval, 1981). Le caratteristiche climatiche necessarie per l'attività degli adulti di *Rh. appendiculatus* sono affrontate nel Capitolo 3.2, e vengono presentate brevemente in Tabella 1. Il periodo in cui tutte queste condizioni si verificano può essere identificato usando semplici dati meteorologici.

Caratteristica climatica	Valore soglia per <i>R. appendiculatus</i>
Piuvosità mensile minima	10 mm
Temperatura minima mensile media	15 ° C
Temperatura massima mensile media	30 ° C ¹
Fotoperiodo minimo	11 ore di luce/giorno

Tabella 1 – Caratteristiche climatiche idonee a *R. appendiculatus*

¹Omaggiore di 30°C se accompagnata da piovosità mensile > 20 mm.

OSPITI

Come già accennato, il parassita responsabile della ECF sembra essere originario della fauna selvatica e solo successivamente adattato al bovino. Sebbene non sia stato ancora possibile chiarire il ruolo attuale dei bufali selvatici nell'epidemiologia della ECF, non si può escludere a priori la possibilità di trasmissione di *T. parva* tra bovini e bufali attraverso le zecche (Gachohi et al., 2012).

Quando la ECF è introdotta in una nuova regione, tutti i bovini ne sono suscettibili, e la mortalità negli animali esposti dipende da molti fattori, tra cui l'età: gli animali giovani sembrano essere naturalmente più resistenti all'infezione rispetto agli adulti, al punto che la mortalità nei vitelli suscettibili si aggira intorno al 10-20%, mentre supera il 90% negli adulti (Lawrence et al., 1992a). Un altro fattore di rischio è la razza: gli animali appartenenti alle razze locali sono naturalmente più resistenti alla malattia rispetto ad animali di razza esotica o incroci (D'Haese et al., 1999). Entrambe le razze però possono sviluppare malattia clinica perciò è sempre necessario mettere in atto misure di controllo per evitare eccessive perdite economiche.

L'insorgenza dello stato di portatore (o infetto subclinico) è fondamentale per l'epidemiologia della malattia: alcuni animali rimangono infetti anche dopo un singolo contatto con *T. parva*, diventando quindi una continua fonte di infezione per le zecche (Marcotty et al., 2002). Lo stato di portatore è stato dimostrato in vitro da Kariuki (Kariuki et al., 1995), anche per quanto riguarda i soggetti vaccinati con ITM (si veda il Capitolo 4.3). Bovini di aree endemiche o epidemiche possono diventare portatori di ECF, pertanto permettendo alla malattia di persistere nel lungo periodo (Kariuki et al., 1995) e potenzialmente contribuendo al raggiungimento dell'endemicità della malattia (Marcotty et al., 2002). Questo avviene perché nel portatore si instaura una sorta di equilibrio tra parassita e sistema immunitario, che si riflette in una lenta schizogonia e merogonia. In questo modo l'immunità dell'ospite è continuamente stimolata, e difatti può perdurare per anni anche in assenza di reinfezioni (Marcotty et al., 2002).

2.2.3.2 TRASMISSIONE

La trasmissione della malattia avviene esclusivamente mediante vettore. Il vettore responsabile della ECF è una zecca della famiglia Ixodidae, *Rhipicephalus appendiculatus*. In laboratorio anche altre zecche del genere *Rhipicephalus* ed alcune specie del genere *Hyalomma* sono risultate capaci di trasmettere l'infezione (Lawrence et al., 1983), ma non ci sono prove che dimostrino che ciò avvenga anche in natura (Lawrence et al., 1992a).

La zecca acquisisce l'infezione quando si nutre su di un ospite infetto in una fase clinica della malattia, oppure dopo la guarigione se sono ancora presenti piroplasmii in circolo. Allo stadio successivo trasmetterà l'infezione ad un nuovo ospite durante il pasto di sangue, quando si saranno sviluppati gli sporozoiti nelle ghiandole salivari. Questo sviluppo impiega dai tre ai quattro giorni dall'inizio del pasto di sangue, la trasmissione perciò avviene in ritardo rispetto all'attaccamento della zecca (Lawrence et al., 1992a).

La trasmissione è trans-stadiale mentre non avviene la trasmissione trans-ovarica, e non c'è trasmissione dell'infezione da larva ad adulto se il pasto effettuato dalla ninfa avviene su di un ospite sano (Lawrence et al., 1992a; Uilenberg, 2006). Marcotty et al. (2002) hanno confermato che l'infezione può essere trasmessa sia da ninfe infettatesi allo stadio larvale che da adulti infettatisi allo stadio di ninfa, tuttavia dimostrando che la prevalenza dell'infezione da *T. parva* nelle ninfe è di gran lunga inferiore rispetto alla prevalenza negli adulti. Questo dà prova del ruolo primario degli adulti nella trasmissione della ECF nelle zone in cui è endemica (Marcotty et al., 2002).

La trasmissione artificiale di *T. parva* è possibile in modi diversi, ed è il metodo su cui si basano i protocolli di immunizzazione attualmente utilizzati, dei quali si tratterà più avanti. È dimostrato (Cunningham et al., 1973) che gli sporozoiti infetti ottenuti in laboratorio possono essere conservati in azoto liquido per più di un anno senza perdere le proprie caratteristiche.

2.2.3.3 SINTOMATOLOGIA

La forma classica di ECF descritta da Gray e Robertson (1902) si manifesta con febbre, aumento di volume dei linfonodi superficiali, edema polmonare grave ed è generalmente seguita dalla morte dell'animale.

Il periodo di incubazione dura circa 15 giorni, ma può variare da 8 a 25. Dopo l'incubazione, i primi sintomi comprendono febbre, tachicardia e tachipnea. La febbre è il primo sintomo clinico rilevabile ed insorge contestualmente alla comparsa di cellule infette nel linfonodo afferente. In concomitanza con l'inizio della febbre si verifica anche un brusco crollo della produzione lattea e l'animale gravido può andare incontro ad aborto. Si nota precocemente anche l'ingrossamento del linfonodo parotideo del lato corrispondente all'orecchio attaccato dalla zecca infetta. A distanza di qualche giorno, si può apprezzare il netto aumento di volume anche del linfonodo parotideo contro-laterale, dei linfonodi prescapolari e dei linfonodi precurali. L'animale mostra depressione, letargia e in alcuni casi anoressia, mentre la febbre continua ad aumentare, aggirandosi frequentemente sui 41-42°C. Abbastanza comune è anche la lacrimazione bilaterale, che si accompagna ad ingrossamento palpebrale e, talvolta, a cecità o fotosensibilità (dovuta ad infiltrazione linfocitaria)(Lawrence et al., 1992a).

Di solito la malattia progredisce per una quindicina di giorni, e progressivamente si aggravano la perdita di appetito e il calo della ruminazione, e la perdita di peso diventa notevole. L'animale è atassico, debole e passa molto tempo in decubito.

L'insorgenza della dispnea segna l'ingresso nella fase terminale della malattia, ed è accompagnata da tachipnea, tosse acquosa e da un imponente scolo liquido-filamentoso da bocca e narici. Lo scolo aumenta quando l'animale resta in decubito e negli stadi preagonici finali. Può essere presente edema sottomandibolare e sternale, e all'auscultazione si può rilevare edema polmonare ed idropericardio(Lawrence et al., 1992a).

Ad un certo punto la malattia subisce una rapida variazione: i linfonodi iperplastici iniziano a regredire e la temperatura corporea subisce un repentino abbassamento, le condizioni dell'animale peggiorano rapidamente e l'animale passa dal coma alla morte(Lawrence et al., 1992a).

Una piccola percentuale di animali (circa il 5%) può guarire spontaneamente, ma la convalescenza è lunga e l'animale presumibilmente resterà improduttivo ed immunodepresso per mesi. La malattia può assumere delle caratteristiche meno severe in animali parzialmente immuni o con resistenza innata, ma la piressia e l'aumento di volume del linfonodo superficiale sono comunque presenti anche se regrediscono spontaneamente(Lawrence et al., 1992a).

2.2.3.4 LESIONI ANATOMOPATOLOGICHE

Alla necropsia il reperto più frequente è un grave edema polmonare, con schiuma nei bronchi, in trachea e spesso anche nelle cavità nasali. Altri reperti possono essere enfisema polmonare, idrotorace ed idropericardio. I linfonodi viscerali e periferici sono grigiastri ed aumentati di volume, per l'iperplasia e la necrosi cellulare. I reni mostrano foci o noduli grigiastri sulla corteccia, grandi anche 20 mm: sono aggregati di cellule linfocitarie. Altre lesioni osservate possono essere splenomegalia, opacità della cornea (per aggregati linfocitari), ispessimento della mucosa abomasale (per iperplasia linfatica) e sua congestione, mentre all'interno si possono ritrovare petecchie emorragiche e/o ecchimosi e/o ulcere. L'animale può presentarsi emaciato; con edema sottocutaneo e intramuscolare; ascite; petecchie sulle mucose orali e sulle sierose; anemia ed ittero (Lawrence et al., 1992a).

L'esame microscopico spesso rivela infiltrazioni linfocitiche in altri organi parenchimatosi come interstizio alveolare, fegato, ghiandole surrenali, cuore e midollo osseo. Si possono osservare schizonti in linfociti e linfoblasti e piroplasmii negli eritrociti, a seconda dello stadio dell'infezione (Lawrence et al., 1992a).

2.2.3.5 DIAGNOSI

Il sospetto della malattia si basa sulla sintomatologia e sui fattori di rischio quali: appartenenza ad una razza sensibile, zona in cui la malattia è endemica, presenza di *Rh. appendiculatus* nell'ambiente e/o sull'animale malato. L'assenza di quest'ultima condizione non deve però far escludere la malattia poiché l'infestazione da zecche potrebbe essere lieve (e dunque non riscontrata), oppure il vettore potrebbe essersi già ingorgato e separato dall'animale al rilevamento dei primi sintomi (Lawrence et al., 1992a).

I metodi di scelta per la diagnosi della ECF sono tre e mostrano lievi differenze nei risultati (Nayel et al., 2012), tuttavia presentano caratteristiche diverse che possono essere più utili per uno scopo rispetto ad un altro. I tre metodi si dividono in diretti ed indiretti.

Diagnosi microscopica

La diagnosi diretta consiste nel dimostrare la presenza del protozoo parassita. Durante la fase acuta dell'infezione i parassiti sono molto numerosi e sono visibili analizzando al microscopio ottico strisci di sangue o aspirati linfonodali. I linfonodi di più facile esplorazione sono i parotidei, precurali e prescapolari.

Questo metodo diagnostico manca però di specificità e sensibilità: non è possibile infatti differenziare le diverse theilerie sulla base delle caratteristiche morfologiche (Lawrence et al., 1992a), e in caso di bassa parassitemia essa potrebbe sfuggire all'operatore. Questo non è dunque il metodo di scelta qualora si volessero cercare portatori o infetti subclinici, anche se rimane il metodo più conveniente e pratico per gli allevamenti. Infatti è rapido ed economico, ma effettivamente utile solo in caso di infezione acuta (Nayel et al., 2012).

All'analisi microscopica è possibile identificare due forme di sviluppo di *T. parva*: gli schizonti nei linfociti e i piroplasmii negli eritrociti. Gli schizonti (o "corpi di Koch", in onore del primo scienziato che li descrisse) si trovano all'interno del citoplasma dei linfociti parassitati, nei linfonodi o nella milza (Urquhart et al., 1998). Le loro dimensioni medie sono di 8 micrometri di diametro ma possono variare da 1 a 16 micrometri e contengono corpuscoli di cromatina in numero variabile (quelli dei microschanti sono molto più piccoli e possono arrivare a 36). Se colorati con metodo Giemsa, il citoplasma è basofilo e i granuli di cromatina sono rossi. Il numero di linfoblasti infetti è molto variabile e può raggiungere l'80% nelle infezioni letali. Queste forme sono identificabili tra i 5 e i 15 giorni dopo l'attacco della zecca (Lawrence et al., 1992a).

I piroplasmii intraeritrocitari frequentemente sono "rod-shaped" (a bastoncino), ma sono comuni anche le forme rotonde e ovali. Misurano 1-2 micrometri al massimo e colorati con metodo Giemsa risultano di colore neutro o con citoplasma blu pallido e un granulo di cromatina rosso a un polo (Urquhart et al., 1998). Di solito sono singoli, ma nelle gravi infestazioni se ne trova anche più di uno per eritrocita. La numerosità varia considerevolmente dall'1 all'80% nelle infezioni gravi, come detto prima. I piroplasmii si sviluppano circa 4-5 giorni dopo gli schizonti e solitamente scompaiono una decina di giorni dopo il recupero, anche se in realtà possono persistere indefinitamente (Lawrence et al., 1992a).

Diagnosi sierologica

La sierologia dimostra la presenza di un titolo anticorpale alto nei confronti di *T. parva*. Inizialmente, si dimostrava la presenza degli anticorpi circolanti attraverso il test di fissazione del complemento, in seguito si è passati al test anticorpale di immunofluorescenza indiretta (IFAT- Indirect Fluorescent Antibody Test). Questo test, seppure ancora usato in molte parti del mondo, non permette una interpretazione oggettiva del risultato e manca di specificità. Era infatti comune

ottenere cross-reattività tra specie di *Theileria*, in particolar modo con *T. taurotragi* (Lawrence et al., 1992e). Inoltre, non tutti i laboratori possiedono un microscopio a immunofluorescenza. Per questi motivi, è stato messo a punto successivamente quello che è il test sierologico di scelta nella diagnosi di ECF: il test ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assays). Questo test non mostra cross-reattività tra *T. taurotragi*, *T. mutans*, *T. annulata* o *T. buffeli*, ma anzi è caratterizzato da alta sensibilità (Lawrence et al., 1992a). Con questo metodo si possono riscontrare gli anticorpi formati dopo una sola infezione con *T. parva*, per un periodo di tempo più lungo che con il test IFAT (Lawrence et al., 1992a). Inoltre, una volta standardizzato il test è applicabile su larga scala.

L'analisi sierologica è utilizzata per rilevare la presenza di *T. parva* in una certa zona, e per determinarne prevalenza, incidenza e stagionalità. È impiegata nella diagnosi di infezioni subcliniche ma può andare incontro a falsi-positivi e falsi-negativi, dovuti a cross-reattività (falsi positivi) o debole risposta immunitaria specifica (falsi negativi). Inoltre, non permette di differenziare tra le infezioni attuali e le esposizioni precedenti, fatto di primaria importanza quando si cerca di identificare dei soggetti portatori (Altay et al., 2008).

Diagnosi biomolecolare

La diagnosi tramite metodiche biomolecolari è una tecnica innovativa che si sta progressivamente diffondendo. In laboratori adeguatamente attrezzati è possibile, attraverso la metodica/il metodo della PCR (Polymerase Chain Reaction), rilevare precocemente l'infezione da *T. parva*, individuare i soggetti che dopo l'infezione rimangono portatori e riconoscere l'infezione anche nei casi di bassa parassitemia eventualmente sfuggita alla diagnosi microscopica (Lawrence et al., 1992a). Questo metodo, che amplifica ripetutamente una specifica sequenza di DNA presente nel genoma dell'organismo target a partire da campioni biologici quali sangue e tessuti dell'ospite, permette di ottenere un prodotto facilmente rilevabile,

e presenta una sensibilità 100 volte superiore alla microscopia diretta (Böse et al., 1995) tuttavia limitata dalla quantità di DNA target presente nel campione. L'alta specificità consente inoltre di distinguere *T. parva* dalle altre infezioni acute di *Theileria* spp. fornendo dati epidemiologici più precisi (Ogden et al., 2003). La PCR ha infine il vantaggio di essere un test di laboratorio rapido, specie-specifico, e che non richiede l'utilizzo di animali da laboratorio (Ogden et al., 2003).

Ciò nonostante anche questo test può andare incontro a falsi negativi a causa di inibitori della polimerasi presenti in sangue o in altri campioni biologici. Per evitare questo inconveniente, devono essere utilizzati protocolli precisi (Böse et al., 1995).

Questa tecnica moderna fatica ancora a trovare una applicazione su larga scala e stenta a sostituire i test sierologici come metodo di scelta nelle indagini epidemiologiche, mentre è molto usata come test di conferma o come marker per ceppi vaccinali (Lawrence et al., 1992a). Il suo utilizzo è facilitato dall'esistenza di supporti (come i filtri di carta Filterpaper Whatman® utilizzati nel presente studio) per conservare campioni biologici dai quali ricavare, in un secondo momento il DNA.

2.2.3.6 DIAGNOSI DIFFERENZIALE

Da un punto di vista clinico la ECF deve essere differenziata dalle altre malattie febbrili fatali presenti nelle stesse zone, le cui caratteristiche comuni di emaciazione, stress respiratorio, diarrea, opacità corneale ed iperplasia linfonodale possono confondere. Per via della presenza di ulcere sulle mucose orali e nasali, congiuntivite e reazioni infiammatorie necrotizzanti si possono escludere Peste Bovina, BVDMD e Febbre Catarrale Maligna. La Pleuropolmonite Contagiosa Bovina e le altre malattie respiratorie presentano altri sintomi caratteristici quali tosse e stress respiratorio, non rilevanti nei casi di ECF. La Tripanosomiasi acuta non causa diarrea, e le Babesiosi ed Anaplasmosi sono caratterizzate da ittero ed anemia. Si ricorda però che il quadro clinico della ECF può essere complicato da infezioni respiratorie secondarie e/o da contemporanea infestazione/infezione da altri emoparassiti, che possono complicare l'iter diagnostico. Nelle aree in cui questo si verifica, la East Coast fever è la più pericolosa tra le malattie del bovino, perciò essa va data assoluta priorità (Lawrence et al., 1992a).

L'esame microscopico di sangue o tessuto linfatico può rilevare la presenza di piroplasmi o schizonti non appartenenti però alla specie di *Theileria parva parva*.

La diagnosi differenziale tra le specie di *Theileria* sulla base della sola morfologia è generalmente difficile, perché i parassiti si assomigliano molto. I piroplasmi di *T. mutans* sono più grandi di quelli di *T. parva* (Lawrence et al., 1992a). Le due eccezioni sono *T. velifera*, che possiede un caratteristico "velo" associato al piroplasma, e *T. taurotragi*, che mostra delle strutture "a barra" (bar-like) nell'eritrocita infetto (Morzaria, FAO 2014). Tuttavia, le infezioni miste possono generare confusione. Per questo motivo, il metodo più sicuro per differenziare a livello di specie è l'analisi biomolecolare mediante PCR, il metodo più sensibile e specifico attualmente disponibile (Altay et al., 2008).

2.2.4 LE ALTRE THEILERIOSI DA T. PARVA

2.2.4.1 CORRIDOR DISEASE

La “Corridor Disease”, o “Buffalo Disease”, è una malattia acuta e mortale trasmessa dai bufali africani (*Syncerus caffer*), o bufalo cafro, ai bovini dalle zecche.

EZIOLOGIA

L'agente è una sottospecie di *Theileria parva* (*T. parva lawrencei*) tipica del bufalo africano. Questa *Theileria* morfologicamente e sierologicamente è indistinguibile da *T. parva parva*, causa della ECF, e ha un identico ciclo vitale. La *T. parva* isolata dai bufali però può essere considerata diversa perché appartenente ad un ceppo trasmesso, tramite vettore, esclusivamente all'interno della popolazione dei selvatici. Sperimentalmente tuttavia si è visto che dopo ripetuti passaggi zecca-bovino, la malattia diventa indistinguibile dalla ECF (Maritim et al., 1992). Questo dimostra le profonde somiglianze che legano questa malattia alla ECF e motiva l'attuale confusione riguardo la classificazione di queste malattie e dei rispettivi agenti (Uilenberg, 1999).

EPIDEMIOLOGIA

La malattia si manifesta sporadicamente in Africa orientale, centrale e meridionale. In queste zone infatti il parassita è ben distribuito nelle popolazioni di bufali. Il contatto tra bovini e selvatici avviene attraverso il vettore, ed i bovini si infettano quando vengono portati a pascolare nelle zone frequentate anche dai selvatici (Uilenberg, 1999). Il vettore principale è *Rhipicephalus appendiculatus*, la

stessa zecca dura responsabile della ECF, ed occasionalmente anche *R. zambeziensis* e *R. duttoni*, due zecche presenti in ambienti troppo ostili per *R. appendiculatus*. Solitamente nei bufali non causa malattia e il parassita rimane persistentemente presente negli infetti sia nella sua forma di schizonte che in quella di piroplasma (Lawrence et al., 1992b). Al contrario, *T. parva lawrencei* non è ben adattata al bovino e, quando trasmessa, non porta a compimento l'intero ciclo di sviluppo. I bovini sono perciò ospiti a fondo cieco e la malattia è auto limitante: la maggior parte degli infetti muoiono prima che si sviluppino i piroplasmici mentre, nei sopravvissuti, a differenza di quanto accade nei bufali, non si formano sufficienti piroplasmici da infettare un nuovo vettore. Solo in alcuni (rari) casi, la proliferazione intra-eritrocitaria è tale da permettere l'infezione di nuove zecche (Uilenberg, 1999).

SEGNI CLINICI, DIAGNOSI E TRATTAMENTO

I segni clinici della malattia nei bovini sono assimilabili a quelli della ECF, ma la malattia decorre in modo molto più rapido: dopo soli tre o quattro giorni dal primo sintomo gli animali generalmente muoiono. Rispetto alla ECF, non si presentano emaciazione, diarrea e regressione linfonodale mentre anche in questa malattia l'edema polmonare insorge poco prima della morte (Lawrence et al., 1992b). In caso di epidemia, la mortalità supera il 90% (Potgieter et al., 1988).

La diagnosi e il trattamento sono complicate dalla veloce evoluzione della malattia, ma qualora venisse diagnosticata in tempo la terapia più indicata è quella con l'halofunginone o con il buparvaquone. È da tener presente però che in alcuni Stati africani, come il Sudafrica, il trattamento è vietato dalla legge (Lawrence et al., 1992b).

Dopo la FMD, questa è la più importante causa di perdite economiche derivanti dal contatto tra bovini allevati e bufali selvatici, e limita l'introduzione del bufalo per la conservazione della fauna selvatica in aree che sono anche adibite a pascolo (Lawrence et al., 1992b).

2.2.4.2 JANUARY DISEASE

La “Theileriosi Rhodesiana Maligna”, o “January Disease”, o “Zimbabwe Disease”, è emersa in Zimbabwe dopo l’eradicazione della classica East Coast fever. Si tratta di una malattia acuta del bovino, generalmente fatale, ma con possibilità di avere casi lievi o subclinici. Inoltre alcuni soggetti possono diventare portatori. È trasmessa dallo stesso vettore della ECF, la zecca *Rhipicephalus appendiculatus*.

EZIOLOGIA

La malattia è causata da un terzo tipo di *T. parva*, *T. parva bovis* (Uilenberg, 1999). L’agente risultatuttavia morfologicamente uguale alla *T. parva parva* causa della East Coast Fever, ed uguale è anche il ciclo vitale. Alcuni autori ipotizzano che *T. parva bovis* possa essersi selezionata da ceppi resistenti alle misure di controllo utilizzate nell’eradicazione, per cui si stenta ad accettare *T. parva bovis* come un agente distinto. Infine, è stato osservato che *T. parva bovis* non sembra diventare più affine a *T. parva parva* dopo alcuni passaggi zecca-bovino come invece accade per *T. parva lawrencei* (Uilenberg, 1999). In ogni caso la reale differenza tra i due agenti patogeni è ancora oggetto di dibattito.

EPIDEMIOLOGIA E SEGNI CLINICI

Questa theileriosi si manifesta prevalentemente in Zimbabwe. La maggior parte dei casi si verificano tra Gennaio e Marzo, in animali maggiori di un anno, e sono legati alla frequentazione di pascoli infetti o all’introduzione di nuovi individui nella mandria. La fauna selvatica non sembra ricoprire un ruolo epidemiologico importante nella trasmissione della malattia (Lawrence et al., 1992c).

Dal punto di vista clinico, la malattia è molto simile alla ECF, eccetto per il decorso che è più breve. La morte dell'animale può avvenire dopo 3-4 giorni dall'inizio della manifestazione sintomatologica. Un segno molto frequente è la cecità per opacità corneale, probabilmente dovuta a infiltrazione linfocitaria. Sul campo, la mortalità può raggiungere il 90% nelle epidemie più gravi, ma molti animali possono guarire o subire una infezione lieve o subclinica (Lawrence et al., 1992c).

Nelle infezioni da *T. parva bovis*, il numero di schizonti e piroplasmi è inferiore rispetto a quello della forma classica di ECF; le differenze antigeniche sono minime ed è difficile evidenziare le reali differenze tra le due sottospecie di *Theileria* (Uilenberg, 1999). Per le parti di patogenesi, diagnosi e controllo si rimanda ai rispettivi capitoli nella parte dedicata alla East Coast Fever, poiché gli argomenti si sovrappongono. L'unica precisazione in merito deve essere fatta riguardo alla disponibilità di un vaccino: lo stock "Boleni" di *T. parva* sembra essere il candidato migliore per una immunizzazione su larga scala nei confronti di questa theileriosi (Latif e Hove, 2011).

2.2.4.3 THEILERIOSI CEREBRALE

La “turning sickness”, o “theileriosi cerebrale”, è una forma aberrante di theileriosi, causata in Africa orientale da *T. parva* (Lawrence et al., 1992d).

La sua patogenesi non è chiara, ma potrebbe coinvolgere un disturbo immunitario (anche indotto dal parassita), responsabile dell’aggregazione intravascolare dei linfociti con successivi emboli e infarti al sistema nervoso centrale (Stoltz, 1989).

È una forma sporadica che si manifesta in animali con meno di 3 anni nelle regioni in cui *T. parva* è endemica ed infatti sembra che il fenomeno si verifichi in caso di massiva reinfezione di un animale parzialmente immune (Lawrence et al., 1992d).

Dal punto di vista clinico la malattia è afebrile e caratterizzata dall’inizio improvviso di sintomatologia nervosa: *circling*, *head pressing*, cecità uni-bilaterale, atassia, opistotono e paralisi. Questa theileriosi è fatale nella maggior parte dei casi.

La diagnosi è sovrapponibile a quella per la ECF classica, mentre in diagnosi differenziale va confrontata con la Babesiosi cerebrale, heartwater, rabbia, listeriosi, meningoencefalite trombo embolica, encefalo mielite bovina sporadica e avvelenamento da piombo (Lawrence et al., 1992d).

2.3 BABESIOSI BOVINE

Le babesiosi sono delle malattie causate da alcuni protozoi intraeritrocitari appartenenti al genere *Babesia*, famiglia *Babesiidae*, sottordine *Piroplasmorina*, ordine *Eucoccidiorida*, classe *Sporozoasida* e phylum *Apicomplexa*.

La trasmissione avviene attraverso le zecche. In Africa orientale, i vettori riconosciuti appartengono al genere *Boophilus*, recentemente riclassificato come *Rhipicephalus* (Bock et al., 2004), a cui si farà riferimento in seguito.

Questi protozoi sono strettamente specie-specifici e possono infettare una grande varietà di ospiti vertebrati, per questo motivo le babesiosi sono diffuse in tutto il mondo. Anche se assumono nomi diversi a seconda della zona e della specie colpita, il quadro clinico è simile in tutti gli ospiti vertebrati ed è caratterizzato da gradi diversi di anemia, ittero ed emoglobinuria. Per quest'ultimo sintomo caratteristico, in Africa la malattia è meglio conosciuta come "redwater" (de Vos et al., 1992).

2.3.1 EZIOLOGIA

Le specie conosciute in grado di dare malattia nel bovino in Africa orientale sono due: *B. bovis* e *B. bigemina*. Anche se la malattia risulta clinicamente molto simile, alcune volte vengono considerate come due malattie distinte: "redwater asiatica" (o "europea") la malattia causata da *Babesia bovis*, e "redwater africana" quella provocata da *Babesia bigemina* (de Vos et al., 1992).

Nel secolo scorso probabilmente l'impatto della malattia è stato mascherato dalle epidemie di East Coast Fever. Di recente invece si sta assistendo ad un progressivo aumento della prevalenza e dell'importanza economica determinata dall'abbassamento del controllo delle zecche e dalla contemporanea diffusione sia di resistenza agli acaricidi nelle zecche vettrici (de Vos et al., 1992) sia della diffusione in nuovi territori di una zecca vettrice, *R. microplus*.

2.3.2 EPIDEMIOLOGIA

VETTORE

Babesia bovis è la più virulenta tra le due specie, ma *B. bigemina* può avere maggiore importanza economica perché è più diffusa (Figura 2 e Figura 3). Infatti, *B. bigemina* può essere trasmessa da più vettori: *Rhipicephalus microplus* e *Rhipicephalus decoloratus* sono i principali, mentre *Rhipicephalus evertsi evertsi* è sospettato ma non confermato. Al contrario, per *B. bovis* è riconosciuto un solo vettore, *R. microplus*.

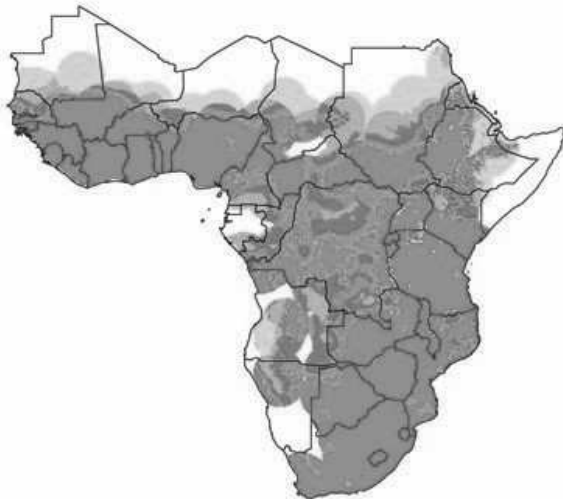


Figura 2—In grigio, zone a rischio di babesiosi bovina da *B. bigemina* sulla base della probabilità di presenza del vettore (da Minjawa and McLeod, 2003)

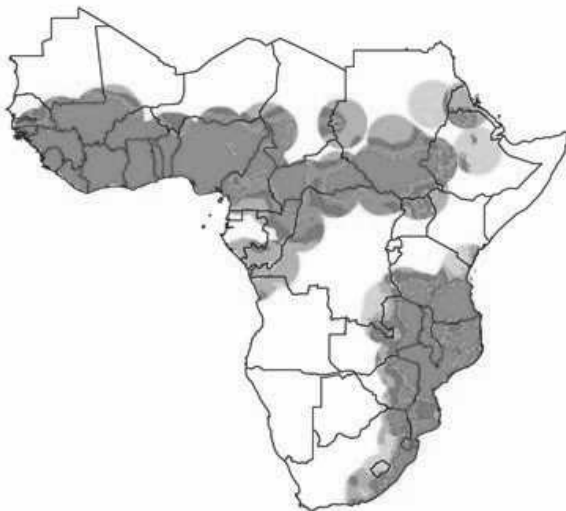


Figura 3—In grigio, zone a rischio di babesiosi bovina da *B. bovis* sulla base della probabilità di presenza del vettore (da Minjawa and McLeod, 2003)

La distribuzione dei vettori è limitata da fattori ecologici come la piovosità e l'intensità delle misure di controllo messe in pratica. *Rhipicephalus microplus* è presente generalmente in aree con alta piovosità, mentre *R. decoloratus* può resistere in climi più freddi e secchi (de Vos et al., 1992). Tuttavia, si sta assistendo ad un aumento della diffusione di *R. microplus*, e questo crea molta preoccupazione. Il problema maggiore è rappresentato dal fatto che il bestiame, in tutta l'Africa orientale, ha avuto poca esposizione a *B. bovis* e l'aumento della diffusione di *R. microplus* può determinare delle perdite importanti (Tønnesen et al., 2004). Infatti nelle zone endemiche dove le zecche sono numerose, l'immunità dell'ospite può essere mantenuta a livelli efficaci da ripetute infezioni e i casi di malattia clinica sono rari (stabilità endemica). Al contrario, nelle aree dove le zecche sono poche o limitate a zone ristrette, la popolazione animale è praticamente priva di immunità. In questi casi, quando si verifica un improvviso aumento della popolazione di zecche dovuto a cambiamenti climatici o alla diminuzione dell'uso di acaricidi, l'incidenza di babesiosi clinica può aumentare in modo significativo (instabilità endemica) (Urquhart et al., 1998). Per la parte specifica riguardo la diffusione dei vettori si rimanda al Capitolo 3.3.

OSPITI

Entrambe le specie considerate sono strettamente specie-specifiche per il bovino. Tutte le razze bovine presenti nella zona sono suscettibili alla malattia. La differenza tra le razze bovine sta nella gravità della malattia, nella velocità di guarigione e nella durata dell'infezione latente.

I soggetti appartenenti a razze esotiche sono molto più suscettibili alle infezioni da *Babesia* spp. rispetto alle razze autoctone: introdotti in aree endemiche, mostrano alta morbilità e mortalità, sia nei soggetti puri che negli incroci (*Bos indicus* x *Bos taurus*) (Montenegro-James et al., 1987). Bock (1999) fece alcune ricerche sull'effetto della razza nel tasso di trasmissione e riguardo la resistenza innata, sia

nei confronti di *B. bovis* che di *B. bigemina*: effettivamente il gruppo di *Bos indicus* utilizzati si dimostrarono più resistenti alla malattia rispetto il gruppo di razza mista (*B. indicus* x *Bos taurus*), giustificando così l'ampio utilizzo delle misure preventive messe in atto laddove gli incroci rappresentino la maggioranza della popolazione (Bock et al., 1999). Le razze locali originarie delle regioni in cui la babesiosi è endemica spesso mostrano un certo grado di resistenza innata alla malattia, risultato della progressiva selezione naturale dei soggetti resistenti di *Bos indicus*, presenti nel continente da molto più tempo, i cui discendenti ora compongono la popolazione bovina locale. In questi animali le conseguenze non sono così gravi come quando la malattia colpisce bovini di razza esotica (Bock et al., 2004). Questa resistenza innata nei confronti del vettore, oltre che della malattia, a lungo termine ha determinato un abbassamento del numero di zecche nei pascoli frequentati da mandrie di razze locali (e loro incroci) e questo ha ulteriormente abbassato la circolazione della malattia.

Inoltre, animali appartenenti a razze europee possono rimanere portatori di *B. bovis* per tutta la vita mentre quelli di razze locali generalmente si liberano dell'infezione nell'arco di un paio di anni. Al contrario, *B. bigemina* persiste raramente per più di un anno a prescindere dalla razza dell'ospite (de Vos et al., 1992).

Infine, esiste un rapporto inverso tra età dell'ospite e resistenza alla malattia, per cui animali giovani sono più resistenti all'infezione rispetto ad animali adulti. Infatti, se infettati entro i 9 mesi d'età, mostrano raramente una forma clinica grave. Oltre a ciò lo stato immunitario dell'ospite è influenzato anche dall'immunità materna (o passiva): in zone in cui la babesiosi è endemica, l'animale giovane acquisisce un certo grado di resistenza attraverso il colostro (Urquhart et al., 1998), resistenza che tuttavia cala progressivamente dopo i due mesi di vita.

Per quanto riguarda gli animali selvatici, sia il bufalo africano che quello asiatico (*Syncerus caffer* e *Bubalus bubalis*) possono sviluppare infezione latente, mentre si esclude che altri animali appartenenti a famiglie diverse ricoprano il ruolo di serbatoi per la malattia (de Vos et al., 1992).

2.3.3 TRASMISSIONE

La trasmissione è trans-ovarica, avviene attraverso femmine adulte gravide che si infettano durante l'ultimo pasto di sangue e sono in grado di trasmettere il parassita alla prole, perciò l'infezione è trasmessa dalle larve, ninfe e adulti infettatisi transovaricamente (Walker et al., 2003).

2.3.4 SEGNI CLINICI E LESIONI ANATOMOPATOLOGICHE di *B.bovis*

Il periodo di incubazione varia tra gli 8 e i 15 giorni, dopo il quale può svilupparsi una infezione acuta (con una forma classica e/o una forma cerebrale) o una infezione subacuta.

L'infezione acuta classica si manifesta con febbre (oltre i 40°C) e solo a distanza di alcuni giorni insorgono inappetenza, depressione, debolezza e riluttanza al movimento. Spesso si presentano anche diarrea ed aborti. L'emoglobinuria è molto frequente; inoltre nei casi protratti possono svilupparsi tremori ed atrofia muscolare. Gli animali infetti possono morire da uno ad alcuni giorni dopo le prime manifestazioni cliniche oppure, se sopravvivono, attraversano una lunga convalescenza caratterizzata da dimagrimento, calo della produzione latte e della fertilità (Urquhart et al., 1998).

La forma cerebrale è iperacuta e fatale. Si manifesta con iperestesia, nistagmo, circling, head pressing, aggressività, convulsioni e paralisi, e può essere o meno accompagnata dai segni clinici della forma classica.

Infine, la forma subacuta consiste negli stessi segni clinici della forma classica ma più lievi, tanto da essere a volte difficilmente rilevabili. Questo è il caso dei vitelli

che si infettano prima dei nove mesi d'età, e che generalmente sviluppano una forma inapparente (de Vos et al., 1992).

All'esame anatomo-patologico, nelle infezioni acute si osserva congestione di vario grado di diversi organi accompagnata da petecchie emorragiche sulle sierose ed ecchimosi presenti su numerosi organi interni. Nelle infezioni prolungate invece si ritrovano maggiormente anemia e ittero. L'emoglobinuria si manifesta come una colorazione rosso scuro delle urine. La bile è densa e granulosa. La milza è aumentata di volume, il fegato è ingrossato e assume una colorazione giallo-brunstra. L'edema polmonare è un reperto infrequente, e questo può aiutare nella diagnosi differenziale con la East Coast fever. Nella forma cerebrale la materia grigia cerebellare ed il cervello assumono un colore rosa ciliegia (de Vos et al., 1992). A livello microscopico si evidenziano accumuli di globuli rossi parassitati a livello di circolazione periferica anche nei capillari e sinusoidi di vari organi (de Vos et al., 1992).

2.3.5 SEGNI CLINICI LESIONI ANATOMOPATOLOGICHE di *B.bigemina*

Rispetto all'infezione acuta causata da *B. bovis*, quella data da *B. bigemina* è meno grave ma la malattia può svilupparsi molto velocemente con grave anemia e ittero a cui fa seguito la morte dell'animale con pochi segni premonitori. L'emoglobinuria è un sintomo più marcato rispetto all'infezione da *B. bovis*, mentre la febbre è meno caratteristica (Bock et al., 2004). Infine, non si manifestano segni clinici neurologici e il ricovero, per i casi meno gravi, è veloce e completo. Gli animali che sopravvivono rimangono infettivi per le zecche dalle quattro alle sette settimane, e portatori di *B. bigemina* soltanto per alcuni mesi (de Vos et al., 1992).

All'esame necroscopico si evidenziano segni di emolisi grave (carcassa pallida, sangue acquoso, emoglobinuria). In questo caso l'edema polmonare è un reperto frequente. L'ittero si manifesta nei casi "prolungati". Anche le modifiche istologiche sono meno frequenti e meno marcate rispetto a *B. bovis*. Solo in questo caso invece si rileva la presenza di necrosi alla polpa rossa della milza con l'eventuale presenza di trombi (de Vos et al., 1992).

2.3.6 DIAGNOSI

La babesiosi si può sospettare sulla base di anamnesi, sintomi clinici e lesioni macroscopiche. Con queste informazioni però non è possibile differenziare l'infezione da *B. bovis* da quella da *B. bigemina*. I tre metodi di scelta per la diagnosi della babesiosi bovina sono gli stessi già trattati nel capitolo relativo alla ECF, per cui verranno trattati solo brevemente.

Diagnosi microscopica

Anche in questo caso la diagnosi tradizionale è effettuata al microscopio ottico, attraverso la valutazione di uno striscio di sangue opportunamente fissato. Dal momento che l'infezione da *Babesia* spp. non coinvolge cellule del sistema linfatico, si andranno a ricercare i parassiti solo all'interno degli eritrociti. Tra le due specie, *B. bovis* è di dimensioni inferiori e misura 2x1,5 micrometri. *B. bigemina* invece è più grande (4,5x2 micrometri) e può occupare l'intero diametro dell'eritrocita (Urquhart et al., 1998). Entrambe le specie sono soggette a notevole variabilità morfologica che rende difficile l'identificazione sulla base di questi caratteri. La forma singola di *B. bovis* può essere rotonda, ovale o di forma irregolare mentre quella doppia generalmente è piriforme o claviforme, e i merozoiti sono separati da

un angolo ottuso. La forma singola di *B. bigemina* invece può essere allungata o ameboide, e quella doppia piriforme con un angolo acuto tra i merozoiti (de Vos et al., 1992).

Questa tecnica è utile nella diagnosi delle infezioni acute poiché esse sono accompagnate da alta parassitemia, mentre è meno utile ai fini dell'identificazione di portatori, che sono caratterizzati da una bassa parassitemia. Le parassitemia da *B. bovis* è spesso molto bassa perciò difficile da identificare, anche nel momento di picco, mentre *B. bigemina* causa una parassitemia maggiore e perciò più facilmente diagnosticabile (de Vos et al., 1992). Inoltre, gli strisci di sangue dovrebbero essere ottenuti da sangue periferico perché esso contiene circa 20 volte i globuli rossi parassitati rispetto alla circolazione centrale (Böse et al., 1995). Il sito migliore per il prelievo è l'arteria auricolare. La tecnica è pratica e veloce, utilissima nelle diagnosi in campo, ma manca di sensibilità e specificità, e facilmente si va incontro a dei falsi negativi (Bock, 2005), poiché molto dipende dalla pratica e dalle competenze dell'operatore. La diagnosi tramite microscopia diretta inoltre può essere complicata da svariati fattori, tra cui untrattamento con babesicidi, che causa la degenerazione e la scomparsa del parassita anche in 24 ore, l'esposizione del vetrino/striscio alla formalina o all'umidità, che complica l'identificazione del parassita, o l'utilizzo di strisci sporchi o non adeguati, in cui è mascherata la presenza del parassita (de Vos et al., 1992).

Diagnosi sierologica

I test sierologici attualmente utilizzati per la diagnosi di *Babesia spp.* sono due:

- tecnica IFAT (Indirect Fluorescent Antibody Test)
- tecnica ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assays) – Per ovviare allo svantaggio dei falsi positivi, se ne stanno sviluppando delle versioni modificate, come il test SELISA (Slide Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assays). Questo test ha dimostrato una maggiore sensibilità rispetto il test IFAT nel rilevare *Babesia spp.* e questo, insieme alle caratteristiche di

semplicità di esecuzione e di affidabilità, lo rendono ideale anche per l'applicazione sul campo (Ravindran et al., 2007). Infine questo test è stato utilizzato con successo anche nella sierologia di bufali, gli unici selvatici legati alla babesiosi di cui si hanno però poche informazioni bibliografiche (Singh et al., 2009). Va tenuto presente che il titolo anticorpale che segue una infezione da *Babesia* spp non è costante per quantità e durata, perciò non può essere correlato ad una resistenza dell'animale nei confronti di reinfezioni: esso varia da soggetto a soggetto, non solo in relazione a razza ed età.

Diagnosi biomolecolare

Questa prova è molto sensibile sia per *B. bovis* che per *B. bigemina*, e permette di distinguere *Babesia* spp. da *Theileria* spp.: i risultati infatti mostrano bande diagnostiche a circa 350 bp e 370 bp rispettivamente per *Babesia* spp. e per *Theileria* spp. (Nayel et al., 2012).

2.3.7 DIAGNOSI DIFFERENZIALE

La babesiosi deve essere messa in diagnosi differenziale con l'anaplasmosi in animali che mostrano anemia ed ittero, soprattutto in assenza di emoglobinuria. Se non si tratta di casi avanzati si possono ricercare i parassiti di *Anaplasma* spp., che diminuiscono con il progredire della malattia. Emolisi, emoglobinuria ed ittero sono sintomi anche di leptospirosi e di condizioni non infettive quali avvelenamento cronico da rame o intossicazioni da piante (*Brassica* spp. e *Allium* spp.) (Kellerman et al., 1988). Infine, in caso di sintomatologia nervosa, la babesiosi cerebrale può essere confusa con altre condizioni nervose del bovino come heartwater (*Ehrlichia ruminantium*), theileriosi cerebrale, encefalomielite sporadica del bovino (causata da *Chlamydophila pecorum*), avvelenamento da piante o da pesticidi, carenza di vitamina B1, o infine meningite o meningoencefalite batterica (de Vos et al., 1992).

2.3.8 CONTROLLO

2.3.8.1 TERAPIA

La chemioterapia è solitamente efficace nei confronti della babesiosi bovina a patto che sia messa in atto prontamente dopo una diagnosi precoce. Se il trattamento viene ritardato fino all'indebolimento dell'animale per via della febbre e dell'anemia, le probabilità di riuscita si abbassano (Vial and Gorenflot, 2006).

Sebbene in letteratura siano riportati un gran numero di composti efficaci, solo pochi sono effettivamente reperibili in commercio. Attualmente, i più utilizzati sono due derivati della diamidina: il diminazene aceturato (alla dose di 3–5 mg/kg) e l'imidocarb (alla dose di 1–3 mg/kg) (Minjauw and Mcleod, 2003).

Ad alte dosi, l'imidocarb riesce ad eliminare *B. bovis* e *B. bigemina* anche dai soggetti portatori ma può diminuire l'instaurarsi dell'immunità che segue una vaccinazione con vaccino vivo (de Vos et al., 1986). Per questo motivo, talvolta si consiglia di utilizzare una dose minore. L'imidocarb è efficace anche nel trattamento dell'anaplasmosi, ed è dunque il farmaco di scelta quando non si riesce ad arrivare ad una diagnosi certa. Inoltre è stato usato con successo anche nella profilassi, anche se può creare problemi per via dei residui. Farmaci anti-infiammatori sono consigliati per ridurre l'infiammazione in particolare in caso di infezione da *B. bovis* (Vial and Gorenflot, 2006).

2.3.8.2 CONTROLLO DELLE ZECHE

Per questa parte si rimanda al capitolo 3 poiché i metodi di controllo delle zecche per quanto riguarda la babesiosi sono gli stessi messi in pratica nei confronti della East Coast Fever, e pertanto saranno approfonditi più avanti.

2.3.8.3 IMMUNIZZAZIONE

Vista la capacità di animali già esposti all'infezione da *Babesi* di sviluppare una immunità protettiva nei confronti di successive reinfezioni, si è cercato di introdurre un vaccino che potesse proteggere anche gli animali appartenenti a razze suscettibili. Inoltre l'infezione da *B. bigemina* genera un alto livello di immunità anche nei confronti di *B. bovis*. Questa protezione tuttavia è univoca, poiché al contrario l'infezione da *B. bovis* non protegge contro i rischi da *B. bigemina* (Wright et al., 1987). In ogni caso, l'immunità nei confronti di entrambi i parassiti dura al massimo 6 anni se non subisce ulteriori stimolazioni (Bock et al., 2004).

L'immunizzazione contro la babesiosi è praticata da molti anni nei paesi tropicali utilizzando il sangue di soggetti portatori (Urquhart et al., 1998). Questo metodo non è esente da rischi dal momento che una parte degli animali può soccombere per gravi reazioni cliniche ed esiste la possibilità di trasferimento, attraverso il sangue, di altri patogeni (Minjauw and Mcleod, 2003). Una miglioria significativa di questo metodo è stata raggiunta in Australia, con l'aumento dell'efficacia del vaccino e della sua sicurezza, attenuando il patogeno attraverso passaggi seriali su vitelli splenectomizzati (Callow et al., 1997). Tuttavia, il rischio di diffondere inavvertitamente altri patogeni del sangue rimane: BVD (Bovine Viral Diarrhoea) e Leucocitosi Bovina Enzootica per prime. Inoltre, essendo un vaccino vivo, il mantenimento della catena del freddo è essenziale per una efficace distribuzione. L'unico reale vantaggio è la forte protezione che inducono (Minjauw and Mcleod, 2003).

Per quanto ci siano stati dei progressi nello sviluppo di vaccini contro la babesiosi, attualmente non è in commercio un vaccino davvero efficace e sicuro, e nelle ricerche che utilizzano antigeni vaccinali o vaccini ricombinanti non si sono ancora raggiunti livelli di protezione paragonabili a quelli di un vaccino vivo (Minjauw and Mcleod, 2003). Il vaccino risolverebbe il problema dell'introduzione di nuovi animali in zone endemiche per il miglioramento genetico (Urquhart et al., 1998).

3. I VETTORI: LE ZECCHE

3.1 ASPETTI GENERALI

Le zecche sono Artropodi appartenenti all'ordine Acarina e alla classe Aracnida. Se ne distinguono due famiglie: *Ixodidae* e *Argasidae*, rispettivamente conosciute come "zecche dure" e "zecche molli" per via delle loro caratteristiche morfologiche.

Le zecche *Ixodidae* sono di maggior importanza veterinaria rispetto alle *Argasidae*, in quanto sono responsabili di una varietà di perdite, causate sia dall'effetto diretto dell'attaccamento, mediante iniezione di tossine, sia attraverso la morbilità e la mortalità delle malattie che trasmettono. Le zecche infatti sono ectoparassiti ematofagi e dunque possono essere vettori di malattie infettive e parassitarie degli animali e dell'uomo, vale a dire delle cosiddette "tick borne diseases" (TBD).

In particolare quattro gruppi di TBD rappresentano un limite per la produzione zootecnica bovina: anaplasmosi, cowdriosi, babesiosi e theileriosi. Tra queste, le ultime due (piroplasmosi bovine) sono trasmesse da alcune specie di *Boophilus* (ora *Rhipicephalus*) e *Rhipicephalus*, e rappresentano il problema principale degli allevamenti rurali di vaste parti del continente africano (Norval and Horak, 1992).

3.1.1 CICLO VITALE

Il ciclo vitale si articola in quattro stadi, da uova a larva a ninfa ad adulto. Nelle tre fasi mobili le zecche sono parassiti temporanei ematofagi.

Le zecche si distinguono a seconda del numero di ospiti coinvolti in un ciclo vitale. Le più comuni sono quelle a tre ospiti, come *Rhipicephalus appendiculatus*, le cui uova deposte sul terreno schiudono in alcune di settimane. Le larve salgono su un primo ospite, effettuano il primo pasto di sangue e cadono in terra, dove avviene la

prima muta da larva a ninfa. La ninfa sale su un secondo ospite e, dopo essersi nutrita, lascia l'ospite ed effettua la muta nell'ambiente. L'adulto seleziona un terzo ospite (che può essere lo stesso della ninfa, un altro della stessa specie o di un'altra specie) sul quale avverrà l'accoppiamento e l'ultimo pasto di sangue.

L'accoppiamento avviene infatti sull'ospite nella maggior parte delle specie, mentre in alcuni casi (*Ixodes* spp.) le femmine vengono fecondate prima, a terra ancora a digiuno. I maschi restano sull'ospite e cercano di fecondare più femmine mentre queste si nutrono. Le femmine invece si accoppiano una volta sola, prima di completare il pasto. Nella fase finale del ciclo esse necessitano di grandi quantità di nutrimento per produrre le uova ed una volta ingorgate si lasciano cadere a terra dove depongono in una sola volta da 2000 a 20.000 uova (Urquhart et al., 1998). Le femmine muoiono dopo la deposizione, i maschi dopo gli accoppiamenti. Il ciclo vitale delle zecche a tre ospiti è lento, può durare dai sei mesi a più di un anno. Tra una muta e l'altra infatti le zecche attraversano anche una fase di inattività di una o due settimane in cui lo scudo chitinoso, molle subito dopo la muta, si deve indurire. *Boophilus* spp (ora *Rhipicephalus*) invece ha un ciclo vitale a un ospite: le uova schiudono nel terreno e dopo diverse settimane di sviluppo la larva si sposta in cerca dell'ospite. Dopo averlo trovato, la larva si attacca, si ingorga e muta a ninfa. La ninfa si attacca sullo stesso ospite e, allo stesso modo, si ingorga e muta ad adulto. Anche gli adulti effettueranno il pasto di sangue sullo stesso ospite, e cambieranno posizione solo per l'accoppiamento. In questo tipo di ciclo vitale, tutti e tre i pasti avvengono sullo stesso ospite e il ciclo è breve: queste zecche impiegano circa due mesi di sviluppo nel terreno da uova a larva, e l'adulto si sviluppa in circa tre settimane sull'ospite.

Il ciclo a due ospiti è simile a questo ma solo le larve e ninfe si nutrono sullo stesso ospite, l'adulto invece seleziona un ospite diverso. Questo è il caso di *Hyalomma detritum detritum* e *Rhipicephalus evertsi evertsi*.

3.1.2 ALIMENTAZIONE

In tutte le fasi mobili del ciclo vitale, le zecche si nutrono solo del sangue dell'ospite. Si ancorano alla cute attraverso l'apparato buccale, composto dai cheliceri, dai palpi e dall'ipostoma. Le zecche secernono con la saliva una sostanza cementante che incolla i palpi all'epidermide e permette ai cheliceri (taglienti) e all'ipostoma di penetrare la cute. Queste ultime due strutture formano un foro nel derma e rompono i capillari più superficiali: in questa lesione si accumulano sangue e linfa che verranno assorbiti dalla zecca tramite l'ipostoma (Walker et al., 2003).

Durante il pasto di sangue le zecche rigurgitano nella ferita i liquidi di scarto del pasto precedente. Questo spiega l'altissimo potere vettoriale che hanno questi artropodi nei confronti di malattie batteriche e protozoarie (Urquhart et al., 1998).

L'alimentazione delle *Ixodidae* è lenta perché lo scudo rigido esterno deve aumentare di dimensioni prima che la zecca possa espandersi per l'ingestione di sangue. Le larve completano il pasto di sangue in 3-5 giorni, le ninfe 4-8 e le femmine adulte da 5 a 20 giorni. Quando le femmine completano l'ingorgamento di sangue si staccano e si lasciano cadere sul terreno (Walker et al., 2003).

3.1.3 RICERCA DELL'OSPITE

Il 90% delle *Ixodidae* parassitano specie selvatiche e sono caratterizzate da una bassa capacità di spostarsi; attendono nell'ambiente che l'ospite passi loro accanto. In questo modo sia l'infezione che la successiva dispersione del parassita sono ospite-dipendenti. Le zecche del genere *Rhipicephalus* si comportano in questo modo. Alcune zecche invece, per esempio dei generi *Amblyomma* e generi *Hyalomma*, sono cacciatori/predatori attivi (active hunters): si spostano sul suolo/terreno alla ricerca degli ospiti (Walker et al., 2003).

Ricordiamo che i bovini di razze locali sono simili agli animali selvatici perché, avendo co-esistito per migliaia di anni con le zecche, hanno sviluppato un certo grado di resistenza alle infestazioni (Wesonga et al., 2006).

3.1.4 HABITAT E DISTRIBUZIONE

La distribuzione delle zecche non è statica e cambia in risposta a un gran numero di fattori, tra cui spostamento di ospiti, modifiche nelle procedure locali di controllo tramite acaricidi, selezione di zecche resistenti agli acaricidi e variazioni stagionali di piovosità (Tønnesen et al., 2004).

Il numero di zecche presenti su di un animale dipende dalla densità di zecche nell'ambiente, che a sua volta può subire delle fluttuazioni di stagione in stagione o di anno in anno, in conseguenza a fattori climatici come la piovosità (Wesonga et al., 2006). Una popolazione di zecche può crescere in un particolare habitat grazie a fattori relativi all'ospite, come disponibilità di ospiti per le fasi intermedie e loro suscettibilità e resistenza all'infestazione. La natura della vegetazione e in particolare le caratteristiche del suolo (*grass layer*) influenzano le fasi libere del ciclo vitale. Le zecche sono significativamente più numerose nella vegetazione vicino a fonti d'acqua permanenti. La distribuzione delle zecche è influenzata anche dalla copertura della vegetazione, dall'umidità e dalla piovosità annua (Wesonga et al., 2006).

3.2 RHIPICEPHALUS APPENDICULATUS

Rhipicephalus appendiculatus è una zecca della famiglia *Ixodidae*, genere *Rhipicephalus*, comunemente nota come zecca marrone dell'orecchio ("brown ear tick") per via del colore brunoastro e della preferenza di localizzazione.

3.2.1 CICLO VITALE

Rh.appendiculatus è una zecca a tre ospiti (Figura 4). In tutte le fasi di sviluppo le zecche si ingorgano in 4-7 giorni. La femmina ingorgata depone da 3000 a 5000 uova nel terreno. Queste si schiudono in 20-90 giorni. L'intero ciclo di vita può essere completato in tre mesi in condizioni ambientali favorevoli.

Nelle zone sub-equatoriali, gli adulti non si nutrono subito dopo la muta da ninfa ma entrano in diapausa durante la stagione secca ed aspettano fino alla ripresa delle piogge per la riprendere la ricerca dell'ospite, mentre non ci sono dati che dimostrino l'influenza del clima nell'attività vitale di larve e ninfe. In queste zone infatti il clima è composto dall'alternanza di stagioni secche con stagioni umide, e il ciclo vitale della zecca è in sintonia con esso. Più ci si avvicina all'equatore più queste caratteristiche di stagionalità vengono perse, per cui non si assiste più ad un picco stagionale di abbondanza e la zecca riesce a compiere anche più di un ciclo vitale nello stesso anno (Norval e Horak, 1992).

È ragionevole considerare una media mensile di 10 mm di pioggia come il minimo per l'attività della zecca adulta (Short e Norval, 1981). Il ruolo della piovosità nel regolare il ciclo vitale dei vettori è ovviamente influenzato dagli altri parametri climatici, diversi per ciascuna località presa in esame. Altra caratteristica climatica necessaria è una certa temperatura, che controlla, attraverso l'evaporazione, l'umidità del microclima. La temperatura minima che sembra causare un rapido declino dell'attività del vettore è stimata attorno ai 15 gradi Celsius. Al contrario, una temperatura superiore ai 30 gradi Celsius causa non solo l'aumento di mortalità

di uova e larve, ma anche un calo dell'attività degli adulti se non accompagnata da almeno 20 mm di pioggia/mensili (Short e Norval, 1981). Infine, la durata del fotoperiodo può influenzare il ciclo di *Rh. appendiculatus* ovviamente solo laddove se ne verificano variazioni stagionali significative. In ogni caso, sono necessarie per l'attività del vettore almeno 11 ore di luce giornaliera (Short e Norval, 1981). Il periodo in cui tutte queste condizioni si verificano può essere identificato usando semplici dati meteorologici.

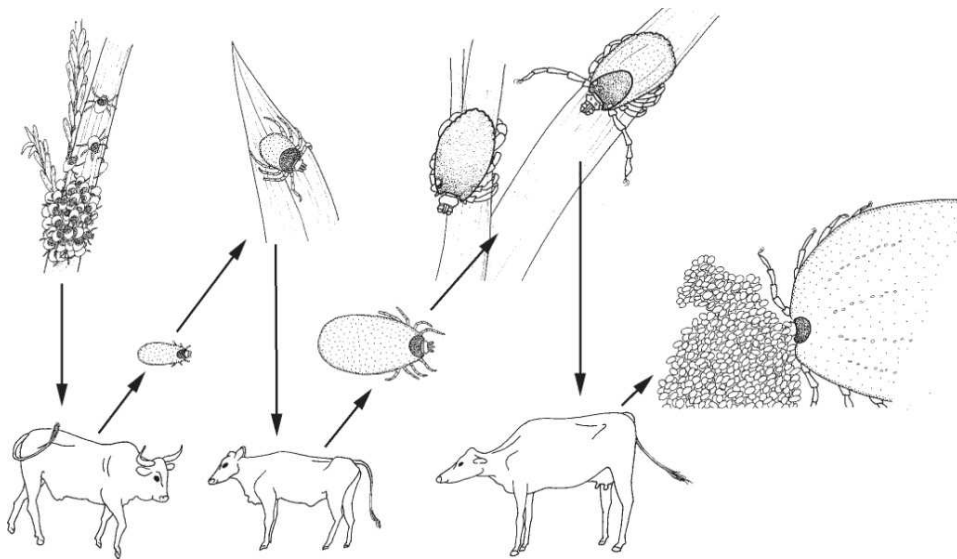


Figura 4 - Ciclo vitale di *Rhipicephalus appendiculatus* (da Walker et al., 2003)

3.2.2 OSPITI

Rh. appendiculatus ha un ampio spettro di ospiti. Tipicamente, gli adulti parassitano grossi e piccoli ruminanti, domestici o selvatici. Le forme immature si trovano su ruminanti ed anche su altri mammiferi, come equidi, carnivori e lepri.

Tra le specie domestiche, la più interessata è quella bovina che può essere parassitata in forma massiccia da zecche in tutti gli stadi. Tra le specie selvatiche, *R. appendiculatus* è stato ritrovato su numerose specie, come impala, bufalo africano,

antilope alcina, nyala, tragelafò striato, kudù e antilope nera (Norval and Horak, 1992). Gli adulti si attaccano in prevalenza sul padiglione auricolare esterno ma in caso di alte infestazioni possono trovarsi anche su altre parti del corpo come attorno agli occhi e alle corna. Le forme immature si ritrovano soprattutto su collo, testa, estremità degli arti e giogaia (Walker et al., 2003).

3.2.3 DISTRIBUZIONE E HABITAT

Questa zecca è presente in tutta l'Africa centrale, meridionale ed orientale. In Tanzania, si ritrova soprattutto nelle zone centro-occidentali e nella porzione meridionale (Norval e Horak, 1992). *Rh. appendiculatus* preferisce i climi umidi e gli ambienti con una buona copertura della vegetazione, come le foreste/aree boschive. La distribuzione varia molto a seconda della stagione e a seconda dell'intensità del pascolo. In caso di eccessivo sfruttamento del pascolo la zecca può sparire per un periodo.

3.2.4 IMPORTANZA VETTORIALE

Rh. appendiculatus è il vettore principale della East Coast Fever, della Corridor Disease e della theileriosi dello Zimbabwe. Queste tre malattie sono causate da ceppi diversi di *Theileria parva* e verranno trattate in seguito. Inoltre questa zecca può trasmettere anche *Theileria taurotragi*, agente della theileriosi benigna bovina ed *Ehrlichia bovis*, che causa l'ehrlichiosi bovina. Infine può essere vettore per il virus che causa la malattia di Nairobi nelle pecore. A prescindere dalla presenza di questi patogeni, un'alta infestazione da questa zecca può determinare uno stato di tossicosi a causa di una tossina rilasciata da essa (Walker et al., 2003).

3.3 RHIPICEPHALUS DECOLORATUS

e

RHIPICEPHALUS MICROPLUS

Rhipicephalus (Boophilus) decoloratus è anche conosciuto come “Zecca blu” per via del colore delle femmine ingorgate. È la zecca più comune, diffusa e frequente tra le zecche ad un ospite del bovino in Africa. *R.(Boophilus) microplus* invece è conosciuta in molte parti del mondo semplicemente come “Zecca del bovino”.

R. microplus è più pericolosa di *R. decoloratus* perché vettore sia di *B. bovis* che di *B. bigemina*, mentre *R. decoloratus* può trasmettere solo *B. bigemina*, che tra le due specie di protozoi è la meno patogena. La Tabella 2 riassume le caratteristiche delle due specie.

Tabella 2– Caratteristiche salienti di *R. decoloratus* e *R. microplus*.

Specie di <i>Rhipicephalus</i>	<i>R. decoloratus</i>	<i>R. microplus</i>
Origine	Africana, “Blue tick”	Asiatica, “Cattle tick”
Ospiti	Principale: bovino Marginali: piccoli ruminanti e ungulati selvatici	Bovino
Siti di attaccamento	Posteriori, parte alta degli arti, collo, spalle, giogaia e addome	Addome, giogaia, spalle, fianchi
Ciclo vitale	Durata: 2 mesi circa; 1000-2500 uova	Durata: 7 settimane circa; 1500-3000 uova
Habitat	Savane/praterie e aree boschive a clima temperato	Savane/praterie a clima temperato
Importanza vettoriale	<i>Babesia bigemina</i> <i>Anaplasma marginale</i> <i>Borrelia theileri</i>	<i>Babesia bigemina</i> <i>Babesia bovis</i> <i>Anaplasma marginale</i> <i>Borrelia theileri</i>
Diffusione	Vaste zone dell’Africa sub-sahariana	In espansione

3.3.1 CICLO VITALE

Entrambe sono zecche ad un ospite con comportamento monotropico, come illustrato in Figura 5. La femmina ingorgata di *R. decoloratus* lascia al suolo 1000-2500 uova circa una settimana dopo essersi staccata dall'ospite. Le uova schiudono da 3 a 6 settimane dopo e le larve salgono sulla vegetazione dove aspettano il passaggio dell'ospite. La restante parte del ciclo si sviluppa tutta sullo stesso ospite, come già descritto nella parte introduttiva del capitolo. L'intero ciclo, inclusa la prima fase libera, può completarsi in approssimativamente 2 mesi, pertanto annualmente può essere completato più di un ciclo vitale (Walker et al., 2003).

Per quanto riguarda *R. microplus*, il ciclo vitale è più veloce rispetto a quello di *R. decoloratus* e questo maggior potenziale riproduttivo spiega la rapida diffusione della zecca nelle zone dell'Africa in cui è in competizione con *R. decoloratus* (Walker et al., 2003). Inoltre le femmine depongono circa 500 uova in più.

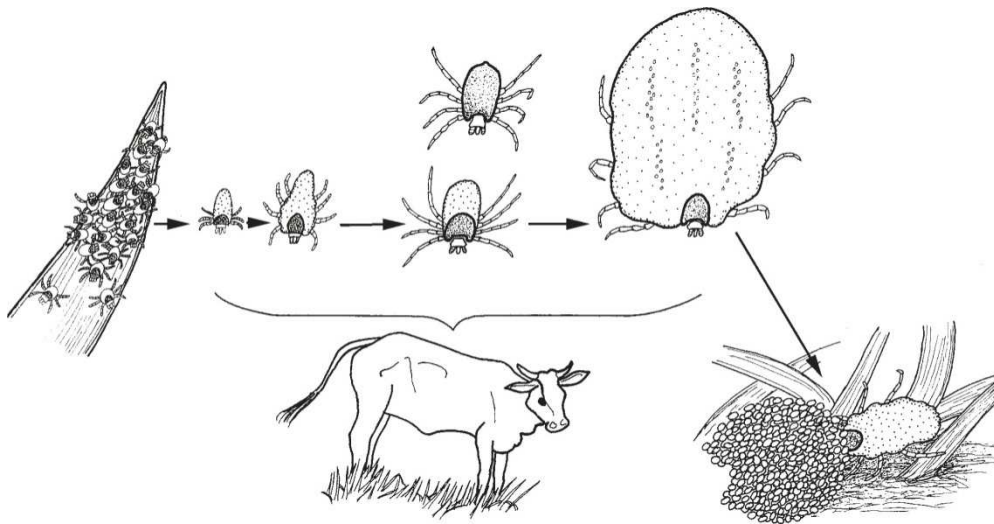


Figura 5 - Ciclo vitale di *Rhipicephalus decoloratus* (da Walker et al., 2003)

3.3.2 OSPITI

I bovini sono i maggiori ospiti di *R. decoloratus*, ma la zecca occasionalmente può nutrirsi su cavalli, asini, piccoli ruminanti e ungulati selvatici. I siti di attaccamento sul bovino preferiti dalla zecca (in tutti gli stadi) sono i posteriori, la parte alta degli arti, il collo, le spalle, la giogaia e l'addome.

Il bovino è l'unico ospite di *R. microplus*, e i siti di attaccamento sono l'addome, la giogaia, le spalle ed i fianchi (Walker et al., 2003).

3.3.3 DISTRIBUZIONE E HABITAT

R. decoloratus si ritrova nelle zone a clima temperato tipico delle savane/praterie e aree boschive adibite a pascolo. Habitat favorevoli si trovano in tutta l'Africa subsahariana, zona di cui è zecca autoctona anche se in molte parti del continente (Tanzania compresa) si trova in competizione con *Rhipicephalus microplus* (Zeman and Lynen, 2010), zecca che occupa lo stesso habitat. Infatti *R. microplus* è stato introdotto in Africa orientale dal Madagascar (anche se l'origine è asiatica) e attualmente è ancora in diffusione (Walker et al., 2003).

3.3.4 IMPORTANZA VETTORIALE

R. decoloratus è vettore di *B. bigemina*, agente della babesiosi bovina. Questo parassita è trasmesso solo dalla zecca in fase di ninfa e/o di adulto, dopo una trasmissione trans-ovarica dalla precedente generazione di zecche. Una volta stabilitasi nel vettore, *B. bigemina* può essere trasmessa a più di una generazione successiva senza aver bisogno di reinfezioni (Walker et al., 2003).

Entrambe le zecche in esame possono trasmettere anche *Anaplasma marginale* (agente dell'anaplasmosi bovina) e *Borrelia theileri* (causa delle spirochetosi nei bovini, piccoli ruminanti e cavalli). Infestazioni gravi di questa zecca riducono il tasso

di crescita degli animali (Walker et al., 2003) e causano perdite economiche per deprezzamento delle pelli (Walker et al., 2003).

L'importanza di *R. microplus* come vettore è però legata principalmente alla babesiosi bovina: questa zecca trasmette sia *B. bovis* sia *B. bigemina*. L'infezione da *B. bovis* è acquisita dagli adulti di una generazione di zecche e viene trasmessa transovaricamente dalle larve della generazione seguente.

3.3.5 LA COMPETIZIONE TRA I DUE VETTORI

R. microplus è il più importante e diffuso vettore della babesiosi a livello mondiale. Nelle zone temperate con alta piovosità, *R. microplus* possiede un maggiore potenziale di crescita rispetto *R. decoloratus*, mentre nelle aree più fredde e secche *R. decoloratus* riesce a persistere anche per il vantaggio di poter approfittare di altri ospiti reservoir, come ungulati selvatici. In molte aree dell'Africa orientale le due specie di zecca sono in competizione, in seguito alla recente introduzione di *R. microplus*, e lo scalzamento della specie autoctona *R. decoloratus* può avvenire nell'arco di 4-10 generazioni di zecche, vale a dire in un periodo anche inferiore ai 3 anni (Sutherst, 1987).

Tuttavia *R. microplus* non è in grado di diffondersi in tutte le aree climaticamente favorevoli (Sutherst and Maywald, 1985): nelle zone in cui è presente anche *R. decoloratus*, avviene interbreeding tra le specie, e si origina una progenie sterile. Questa progenie sbarrava la diffusione di *R. microplus* (Sutherst, 1987; Sutherst and Maywald, 1985).

In condizioni naturali, le due zecche interagiscono in maniera articolata: non solo avviene interferenza con il ciclo riproduttivo, ma devono innanzitutto competere per il loro ospite principale, il bovino. In questo modo, rinforzano reciprocamente l'immunità dell'ospite nei confronti delle infestazioni da zecche (Rechav et al., 1991). Mentre *R. microplus* sopporta meglio questa resistenza, *R. decoloratus* ha il vantaggio di poter parassitare degli ospiti alternativi (Zeman and Lynen, 2010).

I dati raccolti da Lynen (2008) mostrano una situazione diversa rispetto i dati precedenti, tuttavia ancora in evoluzione: eccetto per le zone estremamente secche e fredde, *R. microplus* ha esteso il suo raggio di distribuzione ed è ora presente in tutte le regioni settentrionali della Tanzania. Al contrario, *R. decoloratus*, una volta abbondante in Tanzania, ha grandemente ristretto la propria diffusione agli altipiani del nord e del centro del paese e ad altri rifugi in zone montuose. È stato tuttavia osservato che nelle zone in cui le due specie si sovrappongono, avviene una marcata diminuzione nella densità di popolazione sia per *R. microplus* che per *R. decoloratus* (Lynen et al., 2008). Allo stesso tempo, i bovini portati a pascolare nella zona di sovrapposizione mostrano una tendenza all'esclusione mutuale all'infestazione dalle due zecche (Lynen et al. 2008). Zeman e Lynen (2010) hanno applicato un modello per studiare l'esistenza paraptrica delle due zecche e hanno concluso che, complessivamente, la simulazione indica che una riduzione sostanziale degli habitat per la fauna selvatica (che *R. decoloratus* può infestare come "refugia"), potrebbe accelerare la sostituzione di *R. decoloratus* con *R. microplus* più velocemente di quanto non possa il cambiamento climatico (Zeman and Lynen 2010)

4. IL CONTROLLO

I principali metodi messi in pratica per il controllo delle malattie trasmesse da zecche sono:

- Controllo delle zecche
- Terapia
- Profilassi indiretta

Infine, il cosiddetto “controllo integrato” combina i tre metodi precedenti, e verrà presentato per quello che riguarda la ECF, dal momento che è la malattia verso la quale si presta la maggiore attenzione.

4.1 CONTROLLO DELLE ZECCHE

4.1.1 GLI ACARICIDI

Il metodo più utilizzato per il controllo delle zecche è l'applicazione diretta di acaricidi sugli animali ospiti (Minjauw and Mcleod, 2003). Questa applicazione può avvenire mediante trattamenti diversi: vasche di immersione, corridoi spray, spray manuale, spot-on o pour-on (in inglese: dipping, spray races, hand spray, pour-on, e hand dressing).

Il trattamento acaricida si definisce “low”, “moderate” o “intense” a seconda dell'intervallo che intercorre tra due trattamenti successivi: più di due settimane, tra una e due settimane o meno di una settimana (Swai et al., 2007a). La frequenza di trattamento viene decisa in base al prodotto utilizzato (e alla sua attività residua) e al rischio epidemiologico della data zona e del periodo climatico.

Tuttavia, l'utilizzo di acaricidi presenta svantaggi importanti quali lo sviluppo di resistenza ed il rischio di contaminazione ambientale e dei prodotti di origine

animale, causate dai residui tossici che alcuni prodotti rilasciano (Di Giulio et al., 2008).

I principali composti chimici disponibili sono (Minjauw and Mcleod, 2003):

- Organofosfati e carbammati: disponibili in gran numero, sono efficaci anche a basse concentrazioni ma hanno lo svantaggio di accumularsi in latte e carne; non possono perciò essere utilizzati in questi settori. Inoltre, è dimostrata la presenza di resistenza ad alcuni composti da parte di diverse specie di zecche e i prodotti mostrano scarso effetto residuo per cui necessitano di applicazioni frequenti.
- Piretroidi sintetici: gruppo di acaricidi altamente efficaci, includono molti composti diversi. Possiedono alta attività residua (7-10 giorni) e sono efficaci anche contro le biting flies, ottimi dunque per lotta alla tripanosomiasi. Tuttavia anche in questo caso si è sviluppato un certo grado di resistenza.
- Amidine: l'unico composto utilizzato è l'amitraz, che mostra alta attività residua e non causa accumulo in latte e carne.

Altri composti meno usati sono i lattoni macrociclici² e la benzoil-fenilurea³.

Lo sviluppo di resistenza è un problema ormai diffuso su scala mondiale ma varia a seconda del composto, della zona e delle specie di zecca. Per esempio *Boophilus* spp., vettore della babesiosi, è considerato una specie sentinella poiché è la prima specie a sviluppare resistenza. Questo avviene perché *Boophilus* spp. ha un ciclo vitale ad un ospite (il bovino) e di conseguenza subisce la maggiore pressione selettiva, essendo esposto con maggior frequenza agli acaricidi (Dolan, 1999). Esistono poche strategie che possano effettivamente essere messe in pratica per ritardare l'emergenza di resistenza, a causa dello scarso numero di principi attivi efficaci nei confronti di tutte le specie (Dolan, 1999).

² Non sono degli acaricidi veri e propri ma dei composti chimici antiparassitari, utili sia per gli endo- che per gli ecto-parassiti. Possono essere somministrati in modo diverso ma hanno lo svantaggio di non proteggere dalle malattie trasmesse da zecche, perché le zecche ne risentono solo dopo essersi attaccate. Inoltre causano accumulo di residui in latte e carne (Minjauw and Mcleod, 2003).

³ Questo composto è un regolatore di crescita che blocca il ciclo vitale della zecca interferendone con lo sviluppo. Ha lunga attività residua in latte e carne, ma è l'unico composto veramente efficace per quelle specie di zecche che hanno già sviluppato resistenza (Minjauw and Mcleod, 2003).

Questo metodo di controllo è divenuto meno sicuro negli ultimi quarant'anni per molteplici ragioni, tra le quali l'aumento dei costi e il rischio di danni ambientali. Per questo, il loro uso dovrebbe essere mantenuto al minimo e integrato con approcci alternativi (Minjauw and Mcleod, 2003).

4.1.2 METODI ALTERNATIVI

Un metodo alternativo per il controllo delle zecche è il controllo della vegetazione, che può essere sfruttato per rendere le condizioni ambientali meno favorevoli per il vettore.

Metodi tradizionali come la bruciatura del pascolo durante la stagione secca o prima della stagione delle piogge sono ancora ampiamente utilizzati perché riescono a diminuire la carica infestante (Urquhart et al., 1998). Anche il non utilizzo dei pascoli per un periodo più lungo della vita di una zecca (2 anni per un adulto di *Rhipicephalus* spp.), in assenza di altri ospiti, porterebbe a morte le zecche presenti. Un altro metodo facilmente attuabile potrebbe essere quello della rotazione dei pascoli. Perché questo metodo sia efficace occorre però delimitare bene ciascuna zona e gestirla correttamente.

Altri sistemi di controllo includono la selezione di razze bovine con resistenza naturale alle infezioni, ma poiché questo carattere è elevato nelle razze locali e basso in quelle esotiche, la soluzione potrebbe essere l'incrocio fino ad ottenere ibridi abbastanza resistenti ma produttivi (Urquhart et al., 1998).

Nel settore dei piccoli allevatori, la spinta verso allevamenti intensivi più produttivi porta gli animali ad essere confinati in unità a "zero-grazing", dove l'unica possibilità di contatto per il vettore è attraverso l'introduzione di foraggio infestato da zecche. Questo cambiamento potrebbe ridurre molto l'incidenza delle malattie trasmesse da zecche.

4.2 TERAPIA

Per quanto riguarda le theileriosi, il primo farmaco theilericida fu commercializzato negli anni '80, ed era l'halofunginone lattato (Terit®), che fu seguito dal parvaquanone (Clexon®) e da un suo analogo più attivo, il buparvaquanone (Butalex®) entro i primi anni '90 (Minjauw and Mcleod, 2003).

I problemi maggiori associati a questi farmaci sono l'alto costo e la distribuzione nel territorio. Per esempio, in Tanzania, l'halofunginone è stato ritirato per questioni di sicurezza mentre sono acquistabili *Butalex* (buparvaquanone), *Parvexon* e *Clexon* (parvaquanone entrambi) e *Fruvexon* (Mbwambo et al., 2006), a seconda della casa farmaceutica che li distribuisce. Per esempio in Zambia il buparvaquanone (risultato più efficace in test in vivo) costa quasi 5 volte il parvaquanone (D'Haese et al., 1999). Per questi farmaci non ci sono segnalazioni di resistenza, probabilmente perché il loro utilizzo è relativamente recente e la pressione selettiva esercitata è minima.

Per quanto riguarda il costo, il trattamento di un bovino indigeno di scarsa produttività può equiparare il valore stesso dell'animale (Minjauw and Mcleod, 2003). Chiaramente questo abbassa il loro reale utilizzo in campo. Inoltre una singola dose di farmaco può non essere sufficiente per i casi avanzati, ma, come consigliato da Mbwambo et al. (2006), va valutata volta per volta il numero di somministrazioni necessarie a seconda della patogenicità del ceppo coinvolto, della gravità dell'infezione, dello stato di salute dell'animale e della fase clinica in cui si è iniziato il trattamento (precoce o tardivo).

La via di somministrazione dei theilericidi classici è l'intramuscolare profonda, e la dose utilizzata per il BUTA-Kel è di 2,5 mg/kg BW (Mbwambo et al., 2006), in singola dose o ripetuta dopo 48 h. Il peso vivo dell'animale si può valutare con delle apposite cinture tarate, ma non tutti gli allevatori ne possiedono una perciò i trattamenti spesso avvengono alla cieca. Nei casi gravi si consiglia una terapia di supporto con ossitetracicline, per scongiurare il rischio di infezioni secondarie e, qualora insorgessero sintomi polmonari, si può utilizzare un theilericida

che incorpora il frusemide, un agente diuretico, come il Fruvexon. L'uso sistematico di questi farmaci associati al farmaco theilericida velocizza la guarigione. L'identificazione precoce dei casi clinici di ECF è di primaria importanza poiché permette un intervento rapido ed efficace, con minimo utilizzo di farmaci e dunque minimo costo. Il trattamento è efficace infatti se compiuto abbastanza in fretta da limitare lo sviluppo degli schizonti e il conseguente danno al sistema immunitario (Minjauw and Mcleod, 2003). Questo ovviamente dipende dalla vicinanza dell'allevamento alla città (che facilita l'approvvigionamento di farmaci) e ad un centro diagnostico, oltre che dal riconoscimento dei sintomi clinici precoci, quali ingrossamento del linfonodo parotideo e febbre (Mbwambo et al., 2006). Perciò, in un contesto in cui mancano le competenze per identificare precocemente i segni clinici, o in cui è difficile procurarsi velocemente i farmaci necessari o essi vengono spesso sotto-dosati, l'utilizzo della chemioterapia come sistema di controllo della ECF è sconsigliato.

Va inoltre tenuto presente che alla scomparsa dei sintomi clinici seguirà un periodo di tempo necessario all'animale per riacquisire la propria massa corporea e per ristabilire la produzione latte (Mbwambo et al., 2006). In aggiunta, nessuno dei farmaci in commercio evita che si instauri lo stato di portatore indotto da *Theileria*, infatti gli animali trattati e guariti possono rimanere portatori per periodi prolungati che variano a seconda del ceppo/parassita coinvolto (Dolan, 1999).

Un farmaco theilericida economico, efficace anche nei casi avanzati, che garantisca una guarigione veloce dell'animale e che non consenta l'instaurarsi dello stato di portatore non è ancora stato scoperto né ci sono ricerche in corso (Dolan, 1999).

4.3 PROFILASSI INDIRETTA

4.3.1 VACCINO VIVO

L'unico vaccino attualmente disponibile in commercio per *T. parva* è il "Metodo dell'Infezione e Trattamento" ("Infection-and-Treatment Method", o ITM), nato più di 30 anni fa in seguito all'osservazione dell'immunità naturale che si sviluppa dopo l'infezione (Di Giulio et al., 2008; Marcotty et al. 2002).

Questo metodo consiste nell'inoculazione di 5.9×10^4 sporozoitivi vivi (Di Giulio et al., 2008) in simultanea con un trattamento con ossitetracicline (OTC). Le OTC sembrano controllare l'infezione e promuovere l'immunità attraverso il blocco della maturazione degli sporozoitivi in schizonti dopo la fase di infezione nei linfociti, ma questo meccanismo non è ancora del tutto chiaro (Di Giulio et al., 2008). Questo trattamento provoca una forma lieve o asintomatica di ECF, che però determina un'immunità solida e protettiva nei confronti di parassiti omologhi. In assenza di stimolazioni successive, l'immunità declina nel giro di 36 mesi, mentre in condizioni di esposizione naturale e regolare al parassita essa dura per tutta la vita dell'animale (Minjauw and Mcleod, 2003).

Il processo di produzione del vaccino comprende il passaggio del parassita sia nelle zecche che nel bovino e include la possibilità di ricombinazione. Quello che se ne ottiene è definito "*stabilate*" ("reso più stabile"), che può però potenzialmente variare in composizione, sia quantitativamente che qualitativamente. Questo spiega la necessità di determinare in maniera accurata la sicurezza e l'efficacia della dose immunizzante (Di Giulio et al., 2008). Il vaccino inoltre è costituito da un "cocktail" di ceppi diversi e in Zambia, Malawi, Uganda e Tanzania è utilizzato il "Muguga cocktail", una combinazione dei ceppi Serengeti-trasformed, Kiambu 5 e Muguga (Minjauw and Mcleod, 2003). La questione circa l'uso del Muguga cocktail piuttosto che di ceppi locali è stata a lungo oggetto di dibattito. I vantaggi dell'utilizzo del cocktail si riferiscono al fatto che i ceppi utilizzati siano stati studiati attentamente,

che l'animale risponderà bene alla dose di ossitetraciline e che la combinazione di ceppi abbia mostrato un'ampia protezione. L'uso di questi ceppi al di fuori della regione di appartenenza può però originare il rischio di introdurre ceppi "stranieri" che possano ricombinarsi con i ceppi locali, o introdurre la malattia in aree precedentemente indenni (Martins et al., 2010). Tuttavia, nelle regioni in cui la ECF è endemica, i benefici derivanti dalla vaccinazione superano i rischi ipotetici del suo utilizzo (Di Giulio et al., 2008) e sebbene l'utilizzo di un cocktail sia più complicato rispetto all'uso di un ceppo singolo, la tecnologia e il personale scientifico per la preparazione di un vaccino non sono ovunque disponibili, e l'uso in più Stati dello stesso vaccino risolve questo problema (Uilenberg, 1999)⁴.

I problemi più importanti dell'ITM sono due: gravi reazioni all'immunizzazione e inefficacia nell'indurre protezione immunitaria (Minjauw and Mcleod, 2003).

Dal momento che si tratta di un vaccino vivo, si utilizzano sporozoi di *T. parva* potenzialmente letali, e gli animali sottoposti a vaccinazione potrebbero sviluppare una forma grave della malattia e morire se l'infezione non venisse adeguatamente trattata con le ossitetraciline. Questo problema può verificarsi se viene utilizzata una dose di antibiotico inferiore a quella raccomandata, o se il farmaco supera la data di scadenza e non è dunque più efficace. Il sotto-dosaggio delle OTC si presenta piuttosto comunemente, probabilmente a causa della mancanza di cinture tarate ("weighing bands") al momento del trattamento (Kivaria et al., 2007).

Fino al 1998 il maggior inconveniente dell'ITM in Tanzania era proprio la percentuale di animali che sviluppavano una forma clinica di ECF contestualmente al trattamento vaccinale. Questo rendeva necessario uno stretto monitoraggio degli animali vaccinati dal 14° al 26° giorno post-trattamento (Di Giulio et al., 2008) per intervenire precocemente nei casi di reazione. Accurate ricerche per rendere questo vaccino più sicuro, efficace, gestibile e appetibile per gli allevatori sono state fatte in seguito e dal 2003 l'ITM è stato privatizzato e commercializzato su larga scala in Tanzania (Di Giulio et al., 2008), e i problemi relativi agli standard di sicurezza e di

⁴Inoltre alcuni autori ipotizzano che l'uso di un ceppo singolo locale possa non proteggere gli animali dalla naturale introduzione di ceppi diversi. In realtà Di Giulio spiega (Di Giulio et al., 2008) che il vaccino protegge contro la malattia ma non contro le super-infezioni, per cui stock differenti da quello vaccinale potrebbero infettare animali immunizzati senza però causare malattia clinica.

qualità dei primi stock vaccinali sembrano risolti. Malgrado ciò, bisogna ricordare che la vaccinazione causa direttamente la malattia in forma clinica anche grave in quei soggetti che la stavano incubando, anche se si somministrano adeguatamente le tetracicline (Kivaria et al., 2007).

Un ulteriore progresso è stato fatto sostituendo la formulazione di tetracicline classica al 20% con una formulazione long-acting, al 30% (*Alamycin LA 300®*), che è in grado di ridurre la percentuale di reazioni da una media del 5-6% a meno dello 0,2% (Di Giulio et al., 2008). Le tetracicline si somministrano alla dose di 30 mg/kg, su peso vivo dell'animale (Lynen et al., 2012). Questa miglioria ha anche permesso, a chi gestisce il trattamento, di abbandonare il controllo intenso che precedentemente veniva messo in atto. In questo modo, l'ITM è diventato molto più appetibile sia per il personale veterinario sia per i proprietari del bestiame (Minjauw and Mcleod, 2003).

Come menzionato prima, in alcuni casi gli animali immunizzati non sviluppano protezione immunitaria, invariabilmente per via dell'inefficacia degli sporozoit nell'indurre l'infezione nell'animale ricevente. La causa più comune di questo inconveniente è la rottura della catena del freddo, che può avvenire sia durante il trasporto sia al momento del trattamento. Come tutti i vaccini vivi, i problemi legati alla necessità di mantenere la catena del freddo (gli *stabilate* di sporozoit devono essere mantenuti al di sotto dei -80°C fino al momento dell'utilizzo) costituiscono un ostacolo molto importante nei paesi con scarse infrastrutture (Uilenberg 1999).

Nonostante quanto detto, l'ITM funziona bene se gestito accuratamente, e nel settore dei piccoli allevamenti da latte ha già dato buoni risultati: la sua efficacia nel prevenire i casi di ECF in bovini di razza mista è stata stimata al 97,6% mentre nel prevenire la mortalità da ECF del 97,9% (Lynen et al., 2012). Il vaccino è già in uso su larga scala in molti paesi tra cui Kenya, Malawi, Uganda, Zambia, Zimbabwe e Tanzania, soprattutto nei sistemi tradizionali. Per il settore dei piccoli allevatori, l'ITM sembra una opzione di controllo efficace perché permette di evitare le perdite dovute a mortalità e trattamenti, e in aggiunta permette di risparmiare attraverso la riduzione dei trattamenti acaricidi (Lynen et al., 2012). Malgrado i benefici, il

numero di vaccinazioni eseguite nel settore degli smallholder resta basso a causa di una generale diffidenza dettata dai rischi del trattamento e della scarsa diffusione di veterinari privati che possano effettivamente somministrare il vaccino (Lynen et al., 2012).

4.3.2 VACCINO RICOMBINANTE

Dai primi anni '90 è allo studio presso l'ILRI (International Livestock Research Institute, Nairobi, Kenya) un vaccino ricombinante per la ECF. Il vaccino sfrutta la capacità dell'antigene di superficie p67 dello sporozoita nell'indurre una risposta immunitaria protettiva (Musoke et al., 1992).

Un vaccino ricombinante avrebbe il vantaggio di essere più economico da produrre e più facile da consegnare ed utilizzare rispetto all'ITM. Tuttavia, fino a quando un vaccino di questo tipo non sarà disponibile sul mercato, l'immunizzazione degli animali contro la theileriosi attraverso il metodo dell'ITM offre il prospetto di un metodo di controllo meno costoso e più efficace, evitando l'affidamento continuo ai costosi acaricidi.

4.4 CONTROLLO INTEGRATO E ANALISI DEI COSTI

Il controllo integrato prevede la sinergia di metodi quali immunizzazione e trattamento, riduzione della frequenza del controllo chimico e trattamento dei malati (Dolan, 1999). Questo sistema permette di abbassare i costi dei metodi di controllo presi singolarmente, riducendo la gravità dell'infezione e limitandone le perdite economiche (Mbwambo et al., 2006).

Il costo del trattamento acaricida, che ricordiamo essere tuttora il metodo di controllo più utilizzato, varia in base al numero di trattamenti annuali, al metodo di applicazione, al numero di animali trattati, al costo e alla quantità del prodotto acquistato. Inoltre i costi totali comprendono anche le infrastrutture e/o l'equipaggiamento per il trattamento e il costo del lavoro di chi se ne occupa (Minjauw and Mcleod, 2003). Per esempio, assumendo una frequenza di trattamento di 30 volte all'anno (circa ogni 10 giorni), un trattamento per hand spray può costare dagli 8 ai 30 USD /capo/anno (Minjauw and Mcleod, 2003).

La scelta della tecnica di applicazione viene fatta da ciascun allevatore in base a convenienza, disponibilità di tecnologia e diverso costo. Il dipping e lo spray race sono più convenienti nel trattamento di grandi numeri di animali, mentre i piccoli allevatori, i quali difficilmente hanno accesso a queste strutture, utilizzano l'hand spray o le formulazioni pour-on, più economiche ma egualmente efficaci (Minjauw and Mcleod, 2003).

Per ottimizzare l'uso degli acaricidi, gli allevatori dovrebbero conoscere la biologia e l'ecologia dei vettori presenti nel territorio e mettere in atto un utilizzo strategico dei composti disponibili, come il trattamento stagionale al picco dell'attività delle zecche o l'aumento dell'intensità di trattamento all'inizio della stagione delle zecche. Questi semplici accorgimenti possono essere utili per abbassare i costi e limitare le perdite dovute alle zecche e alle TBD (Minjauw and Mcleod, 2003).

Per quanto riguarda la vaccinazione nei confronti della ECF, nel settore pastorale vengono vaccinati contemporaneamente un gran numero di animali (perlopiù vitelli), e l'ITM ha un costo di 6-7 dollari statunitensi (USD) per animale. Tra i piccoli allevatori da latte invece si raggiungono i 12-14 USD/capo perché si vaccinano meno animali per volta (e dunque viene meno l'economia di scala). In questo caso si tratta prevalentemente di adulti, i quali necessitano di dosi maggiori di OTC per via del maggior peso vivo (Di Giulio et al., 2008). Si ricorda che se l'animale continua a venire a contatto con il patogeno, la vaccinazione non deve essere ripetuta, ma può essere fatta una sola volta per ciascun animale.

Solo recentemente questo metodo si sta diffondendo nel settore dei piccoli allevamenti da latte (Lynen et al., 2012), mentre il 95% delle vaccinazioni in Tanzania avvengono nel settore pastorale (Martins et al., 2010). In questo settore l'ITM ha mostrato protezione anche nei confronti di ceppi di *T.parva* trasmessi dai bufali (*Syncerus caffer*), trasmissione che può avvenire nei pascoli frequentati sia dalle mandrie di bestiame sia da animali selvatici. Inoltre, gli animali immunizzati valgono fino al 50% in più rispetto ad animali non immunizzati (Di Giulio et al., 2008), e questo ha un riscontro economico importante per il proprietario.

Inoltre, in concomitanza all'uso dell'ITM, è necessario ridurre la frequenza del trattamento acaricida per permettere la circolazione del parassita attraverso le zecche, e dunque il rafforzamento dell'immunità creata dal vaccino. Questo elemento costituisce un forte vantaggio per gli allevatori perché, a seconda della riduzione messa in atto, permette di ridurre i costi economici dal 40% al 68% ed aumentare i guadagni netti dal 4% al 58% (Kivaria et al., 2007). I benefici dell'ITM sul piano economico comprendono la diversa resa in latte, il numero marginale di vitelli sopravvissuti e venduti e infine il prezzo di mercato dei vitelli (Martins et al., 2010). Inoltre è raccomandata l'immunizzazione precoce dei vitelli che porterebbe ad un ulteriore risparmio: minore dose di OTC necessaria per l'ITM e assenza di perdita di produzione latte nel periodo successivo al vaccino (Kivaria et al., 2007). Tuttavia, i rischi derivanti dalle altre TBD come anaplasmosi e babesiosi limitano la riduzione dei trattamenti acaricidi che seguono l'ITM (Kivaria et al., 2007).

Uno studio di Kivaria (2007) dimostra l'aumento dell'incidenza di altre TBD dopo l'immunizzazione nella popolazione campione analizzata. Questo fatto da una parte rende scettici alcuni allevatori nei confronti dell'ITM, dal momento che i trattamenti acaricidi non possono essere eliminati, dall'altra ipotizza che l'aumento dell'incidenza delle altre TBD (e in particolare dell'anaplasmosi) potrebbe essere dovuto semplicemente ad una maggiore attenzione nei loro confronti, dettata dall'abbassamento del rischio di contrarre ECF.

Non c'è una strategia universalmente valida ma bisogna considerare volta per volta diversi fattori: la suscettibilità degli animali alla theileriosi e alle altre malattie trasmesse da zecche, le infestazioni di zecche presenti in una data area, il tipo di theileriosi (ECF, Corridor Disease o January Disease) e la situazione epidemiologica in cui l'immunizzazione verrà messa in atto (Uilenberg, 1999).

Lo studio di Kivaria (Kivaria et al., 2007) propone una riduzione di frequenza nel trattamento acaricida del 50%, il giusto compromesso tra benefici economici ed equilibrio epidemiologico. Si assiste però più frequentemente ad una riduzione eccessiva (del 75%) nel controllo delle zecche, che non protegge abbastanza le mandrie dalle altre malattie trasmesse da zecche.

Con tutto ciò, in alcuni casi il vaccino può non essere l'opzione migliore dal punto di vista economico: per esempio, in un'area endemicamente stabile in cui tutti i capi giovani vengono in contatto con l'infezione, l'immunizzazione di animali che possiedono già un alto grado di resistenza innata e hanno scarso valore economico non è economicamente vantaggiosa (Uilenberg, 1999).

Anche il trattamento farmacologico dei casi clinici può sembrare una strategia di successo, ma in realtà è economicamente vantaggiosa solo laddove si possa diagnosticare precocemente la malattia. Mbwambo et al. (2006) riporta una strategia in cui è permessa una esposizione "controllata" di animali giovani all'infezione da *T. parva*: non appena la malattia si manifesta, gli animali vengono trattati con un farmaco theilericida adeguato. Si tratta di un metodo simile all'ITM ma "naturale" e "autogestito", che può stimolare l'immunità e proteggere l'animale

da reinfezioni successive. Tuttavia deve essere messo in pratica con molta cautela perché, come già detto, non sempre i farmaci theilericidi sono efficaci.

Il costo del trattamento per un animale malato varia dai 9 ai 27 USD (D'Haese et al., 1999), e anche trattando precocemente non si assicura una bassa mortalità perché, come già visto, il rischio di infezioni secondarie all'apparato respiratorio resta alto.

Inoltre il trattamento non influisce sul vettore, il quale sarà ancora in grado di ridurre la produttività generale della mandria (D'Haese et al., 1999). Negli allevamenti in cui non è possibile un precoce riconoscimento dei sintomi clinici ci si aspetta un aumento dei costi di trattamento e una diminuzione del tasso di sopravvivenza, fattori che rendono il metodo dell'Infezione e Trattamento la scelta migliore sia dal punto di vista economico che epidemiologico.

In conclusione, la sinergia di queste strategie permette il miglior controllo della East Coast fever nelle zone endemiche (Dolan, 1999). Gli animali immunizzati non sono suscettibili, o lo sono molto meno, a infezioni da *T. parva*, anche se appartenenti a ceppi diversi. Abbassando la frequenza dei trattamenti acaricidi si abbattano i costi, si permette la circolazione del vettore e del patogeno che rafforzerà l'immunità data dal vaccino e la resistenza agli acaricidi emergerà più lentamente. Infine, qualora qualche animale si ammalasse, potrà essere trattato con i farmaci disponibili.

Tuttavia la theileriosi, per quanto più diffusa e importante, non può essere affrontata separatamente dalle altre malattie trasmesse da zecche, e l'immunizzazione può essere solo un aspetto del controllo integrato di tutto il problema, che deve essere economicamente vantaggioso e sostenibile. Le strategie di controllo dipendono da fattori diversi, compresi il valore degli animali, la loro suscettibilità alla ECF e alle altre TBD e la presenza di zecche in una data area. Ultimo ma non meno importante, lo stato epidemiologico di una data regione: il controllo strategico in un'area endemica è ben diverso dal controllo messo in atto per prevenire l'espansione delle theileriosi o dei suoi vettori in una area indenne (Uilenberg, 1999).

PARTE SPERIMENTALE

1. SCOPO DELLA TESI

La presente tesi nasce da un'esperienza personale in Tanzania, svoltasi presso la Missione dei Padri Passionisti di Zenneti, a Muheza, nella regione di Tanga, Tanzania.

L'indagine epidemiologica si è sviluppata in seguito alla segnalazione da parte dei Padri Passionisti delle difficoltà economiche causate dalla East Coast Fever e, più in generale, dalle piroplasmosi presenti nella zona. Lo scopo della tesi era conoscere più a fondo l'epidemiologia di queste malattie, per comprenderne meglio la reale diffusione nel territorio e per suggerire una strategia di controllo mirata a limitarne le perdite. Si è pensato di indagare sia la popolazione bovina interna alla Missione sia un campione della popolazione bovina nei dintorni, appartenente ad allevatori diversi, per poter valutare quanto la diffusione delle piroplasmosi dipendesse anche dal tipo di gestione degli animali.

Lo studio pertanto è stato focalizzato su:

1. Indagine sulla situazione epidemiologica delle piroplasmosi nell'allevamento della Missione di Zenneti, attraverso analisi microscopiche, sierologiche e biomolecolari sul sangue di un campione rappresentativo di animali.
2. Indagine sulla situazione epidemiologica delle piroplasmosi in un campione di allevatori di piccole e medie dimensioni della zona, attraverso analisi microscopiche e biomolecolari sul sangue di un campione rappresentativo di animali.

3. Analisi delle differenze tra gruppi, individuati sulla base delle variabili anamnestiche (età, sesso, razza) e gestionali (tipo di prevenzione, uso del pascolo, uso della ITM, dimensione e qualità manageriale dell'azienda).
4. Comparazione dei diversi metodi diagnostici utilizzati.
5. Identificare alcuni suggerimenti pratici per migliorare le attività di controllo delle piroplasmosi, da mettere in atto all'interno della Missione

2. MATERIALI E METODI

Il progetto è stato suddiviso in due fasi. La prima fase si è sviluppata in campo ed in laboratorio in Tanzania, tra luglio e settembre 2013. La seconda fase è stata portata avanti in Italia presso il laboratorio di Parassitologia e Malattie Parassitarie del Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute (MAPS), Università di Padova, da ottobre 2013 a maggio 2014.

2.1 AREA E POPOLAZIONE DELLO STUDIO

La regione di Tanga è situata nell'angolo Nord-Est della Tanzania (Figura 6) ed è compresa tra la longitudine 39° 06' 00" EST e la latitudine 5° 04' 00.12" SUD. La regione mostra caratteristiche fisiche e climatiche eterogenee, che variano dalle zone costali orientali calde e umide, alle fresche montagne del nord, fino alle pianure semiaride a sud-ovest. Durante l'anno si succedono due stagioni delle piogge, la prima va da marzo a maggio e la seconda da ottobre a dicembre, ed annualmente si riscontrano dai 500 ai 2000 mm di pioggia. La regione è suddivisa in sette distretti amministrativi: Tanga, Pangani, Lushoto, Korogwe, Muheza, Handeni e Kilindi, come illustrato in Figura 7. Da un punto di vista agro-ecologico, vista la biodiversità degli ambienti, nella regione si distinguono cinque zone agro-ecologiche (AEZs) (che non corrispondono ai distretti): la suddivisione in AEZs si basa sul metodo sviluppato per il Kenya da Jaetzhold and Schmidt (1982), e fraziona il territorio sulla base di altitudine, tipo di suolo, piovosità annua (per quantità e per tipologia), capacità di ritenzione idrica del suolo e coltivazioni (Swai et al., 2005a). Nell'area di studio è presente solamente la AEZ 12, che comprende un terreno fertile e collinare ("*fertile upland hillside*") (Swai et al., 2005a) in cui il clima è caratterizzato da una piovosità stagionale, che si manifesta due volte all'anno. Per questo motivo, la regione si presta bene sia all'allevamento sia all'agricoltura.

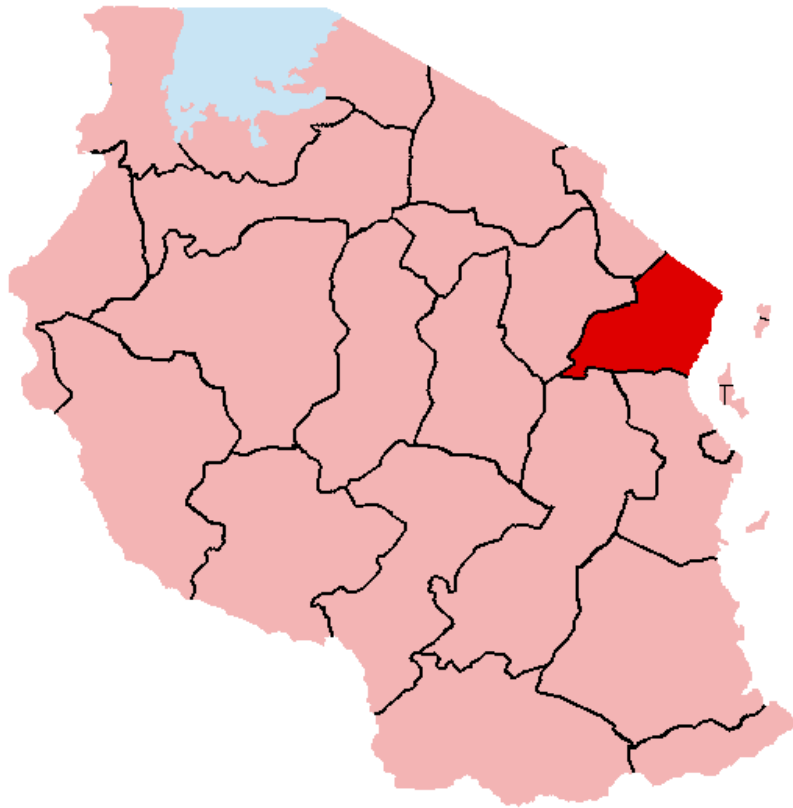


Figura 6– Mappa della Tanzania, in rosso la regione di Tanga⁵



Figura 7– Mappa della suddivisione in distretti amministrativi della regione, in rosso la città di Tanga⁶

⁵ Da http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Tanzania_Tanga.png

⁶ Da <http://www.simbacement.co.tz/About-Tanga.html>

L'indagine epidemiologica è stata condotta in due popolazioni bovine differenti: quella appartenente alla Missione dei Padri Passionisti (Figura 8), un sistema produttivo commerciale di grandi dimensioni, che si trova nell'area rurale denominata Zenneti, nel distretto di Muheza, e quella appartenente a piccoli e medi allevatori delle aree circostanti, in area sub-urbana, nei distretti di Muheza e Korogwe.

La Missione di Zenneti (Coordinate geografiche: 5° 14'38,07" Sud – 38° 39' 21,84" Est) è compresa nella AEZ 12: il terreno è fertile e collinare ("*fertile uplandhillside*"), e si trova a circa 250 m s.l.m. (Swai et al., 2005a).

Nell'indagine sono stati coinvolti anche sette allevamenti esterni, di cui cinque rientrano nel sistema produttivo degli "*smallholder dairy*", cioè dei piccoli produttori di latte che possiedono meno di 10 capi (Phiri et al. 2012), di tutte le età, sessi e razze (Swai et al., 2007a). Gli altri due erano allevamenti da latte di medie dimensioni: uno comprendeva una trentina di capi e mostrava una gestione più simile ai sistemi pastorali tradizionali (Figura 9), e l'altro, con una ventina di capi, era di proprietà di un Convento confinante con la Missione e produceva il latte per auto sostentamento. Anche questi allevamenti erano localizzati nell'AEZ 12.

Contestualmente ai campionamenti, sono state raccolte informazioni circa la gestione e le principali problematiche affrontate dagli allevatori esterni. I dati richiesti riguardavano:

- gestione della mandria: numerosità; razze allevate; pascolo/stabulazione fissa; età, sesso e stato immunitario degli animali campionati.
- gestione veterinaria: conoscenza della ECF; in caso affermativo: stima dei danni causati (capi persi/anno), trattamenti effettuati, tipo di trattamento acaricida e sua frequenza.

La raccolta di informazioni è stata complicata dal fatto che non sempre i proprietari erano presenti al momento dei prelievi e/o i proprietari stessi non sapevano rispondere in maniera specifica ad alcune domande, per cui sotto alcuni aspetti questa raccolta di informazioni è stata incompleta.



Figura 8 – I dintorni della Missione (AEZ 12) e i vitelli *cross-breed* dei Padri Passionisti



Figura 9 – L'allevatore più vicino al sistema tradizionale e i suoi animali di razza locale

2.2 RACCOLTA DEI CAMPIONI

I prelievi di sangue sono stati effettuati su un numero di animali tale da consentire una stima statisticamente significativa della prevalenza. Considerando la numerosità della popolazione interna all'allevamento (170 capi), un intervallo di confidenza del 95% ed un errore standard del 10%, per avere una stima indicativa della prevalenza delle piroplasmosi in allevamento sarebbe stato necessario campionare 62 animali. In realtà, sono rientrati nell'indagine 60 capi interni alla Missione, e 63 esterni. In totale quindi sono stati campionati 123 animali, suddivisi in due gruppi in base alla provenienza e in tre sottogruppi in base all'età.

Gli animali appartenenti alla Missione sono stati identificati come gruppo "ALFA", e sono stati scelti in maniera casuale. All'interno del gruppo gli animali erano distinti in sottogruppi in base all'età: sottogruppo "A" per gli animali con più di 3 anni, "B" se di età compresa tra 1 e 3 anni e "C" per i vitelli con meno di 1 anno di età. In totale, i campioni ALFA sono stati così ripartiti: 30 animali A, 20 animali B e 10 animali C.

Gli animali appartenenti ad allevatori esterni dei dintorni sono stati raggruppati nel gruppo "BETA". All'interno di questo secondo gruppo si sono usate le stesse tre categorie per l'età (A, B, C) ed sono stati campionati 33 animali A, 15 B e 15 C, per un totale di 63 bovini nel gruppo BETA.

I campioni di sangue sono stati prelevati dalla vena giugulare o dalla vena coccigea. Per tutti gli animali della Missione il sangue è stato raccolto in provette sterili VACUTAINER®, sia con anticoagulante (K₃-EDTA) che senza, per le successive analisi sierologiche. Degli animali esterni invece si è raccolto il sangue solo in provetta senza anticoagulante poiché non era prevista l'analisi sierologica. I campioni sono stati identificati e riposti in un frigo portatile fino al rientro nel laboratorio attrezzato presso la Missione, dove poi venivano trasferiti in frigo. I prelievi di sangue erano organizzati durante la mattina di modo che si potesse procedere alle varie analisi nel corso della giornata. Si sconsiglia infatti di preparare un vetrino di sangue dopo più di 8 ore dal prelievo poiché l'anticoagulante potrebbe causare

alterazioni morfologiche negli eritrociti. Inoltre, per quanto riguarda gli animali della Missione, il prelievo doveva avvenire per forza prima dell'uscita al pascolo che avviene tutte le mattine al termine della prima mungitura.

Il siero è stato ottenuto per centrifugazione del campione a 3000g per 20 minuti, e successivamente congelato.

2.3 ANALISI DI LABORATORIO

2.3.1 ANALISI MICROSCOPICA

Con il sangue raccolto nelle provette senza anticoagulante sono stati allestiti due vetrini per ciascun campione. Il vetrino è stato preparato mediante la tecnica dello striscio di sangue, che deve essere fissato prima di poter essere letto. Per la fissazione e la colorazione è stato usato un kit commerciale Haemacolor® (Merck). Al termine, i vetrini sono stati fatti asciugare a temperatura ambiente per qualche ora e successivamente analizzati al microscopio (ingrandimento 100x in olio da immersione). Ciascun vetrino è stato analizzato per 10-15 minuti di tempo.

2.3.2 ANALISI SIEROLOGICA

Il siero ottenuto dalla centrifugazione del sangue è stato spedito all'International Livestock Research Institute (ILRI - Nairobi, Kenya) per le analisi. Sono stati ricercati gli anticorpi per *T. parva*, *T. mutans* e *B. bigemina* attraverso la tecnica ELISA.

2.3.3 ANALISI BIOMOLECOLARE CON PCR

Durante la prima parte del lavoro in Tanzania sono stati predisposti i supporti per l'analisi biomolecolare che sarebbe stata eseguita al rientro in Italia. Sono stati utilizzati due tipi di supporti per PCR: dei filtri Whatman® FTA Micro Card e dei supporti circolari di carta da filtro di diametro 12,5 cm. In contemporanea alla preparazione del vetrino (quindi per tutti e 123 i campioni) sono state distribuite, via via che si procedeva con i vetrini, alcune gocce di sangue sui supporti in carta semplice. Su di un singolo disco di carta si sono potuti raccogliere fino a 6-8 campioni diversi, facendo attenzione a mantenere separate le gocce ed identificandole a matita (l'inchiostro potrebbe danneggiare il campione). Poi si continuava con la lettura del vetrino e, qualora esso fosse risultato positivo o dubbio, si allestiva anche il filtro Whatman®. Questi filtri infatti sono più specifici per questo genere di analisi, poiché la carta è imbevuta di sostanze chimiche utili per la conservazione del campione. Si è quindi deciso di procedere in questo modo, in quanto non erano disponibili filtri Whatman® a sufficienza per coprire l'intero campione. In totale, sono stati raccolti 123 campioni su carta da filtro normale e 37 su filtri Whatman®.

Entrambi i tipi di supporti sono stati fatti asciugare a temperatura ambiente, all'ombra, senza sbalzi di temperatura e successivamente sigillati singolarmente.

Nella seconda fase del progetto, in Italia, si è poi proceduto con l'estrazione del DNA e analisi biomolecolare. Inoltre, per i campioni risultati positivi, si è effettuato il sequenziamento.

Prima di procedere con l'estrazione del DNA è stata fatta una prova per assicurarsi che il protocollo utilizzato fosse valido anche nel caso di campioni su supporti come quelli utilizzati. Normalmente infatti il DNA si estrae direttamente dal sangue, o da supporti specifici per questo tipo di analisi. Sono stati quindi allestiti due supporti per PCR (un filtro di carta normale e un filtro Whatman®) con del sangue di gerbillo infettato sperimentalmente con *B. divergens*. Per prelevare la carta si è utilizzata una comune pinza foratrice per carta, che ritaglia "punch" rotondi del raggio di 3

mm. Successivamente, si è estratto il DNA confrontando quattro prove-controllo diverse: Whatman® con 2 *punch*, Whatman® con 6 *punch*, carta da filtro normale con 2 *punch* e carta da filtro normale con 6 *punch*. Alla PCR, non si sono evidenziate differenze significative tra i campioni, tutti positivi, se non una resa maggiore nei filtri Whatman®. Questa differenza probabilmente è dovuta al fatto che la carta Whatman®, essendo più spessa, assorbe una maggiore quantità di sangue. Per questo motivo in seguito, nell'analisi dei campioni raccolti, sono stati ritagliati 6 *punch* quando il supporto era la carta Whatman®, e 8 quando si trattava di carta da filtro normale. La pinza foratrice è stata disinfettata con un germicida e lavata con acqua *deionizzata* dopo ogni campione.

Per l'estrazione è stato utilizzato il kit NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel, Düren, Germany), e il protocollo per l'estrazione del DNA da campioni di sangue.

Per la PCR, la coppia di *primers* scelta è specifica per *Babesia* spp. ed amplifica un segmento di 460-520 bp del 18S rRNA (Herwaldt et al., 2003):

- RLB-F2 (5'-GAC ACA GGG AGG TAG TGA CAA G-3')
- RLB-R2 (5'-CTA AGA ATT TCA CCT CTG ACA GT-3')

È stata allestita una PCR in un volume di reazione di 30µl contenente: Buffer 1X (Platinum, Invitrogen), 1.6 mM di MgCl₂, 1U di Taq (Platinum, Invitrogen), 0.2mM di ogni nucleotide (dNTP Mix, Promega, USA), 0.5 µM di ogni *primer* (Invitrogen) e 3 µl di DNA. Il ciclo di amplificazione è stato condotto in un termociclatore TPersonal (Biometra, Germany) secondo il protocollo qui riportato:

2' a 94°C, 30" a 94°C, 30" a 64°C, con una diminuzione di 0.25°C per 17 cicli fino a 60°C, 30" a 94°C, 30" a 60°C, 30" a 72°C per 25 volte, seguito da un passaggio finale di 7' a 72°C.

La corsa elettroforetica è stata realizzata su gel di agarosio al 2% contenente SYBR safe (Invitrogen). La lettura è stata eseguita utilizzando l'analizzatore d'immagine Fluor S (BioRad, USA) e il programma QuantityOne.

I campioni risultati positivi alla PCR sono stati sequenziati solo con il *primer reverse* RLB-R utilizzando lo stesso *primer* impiegato nella PCR. Le sequenze sono state corrette mediante analisi visuale degli elettroferogrammi utilizzando ChromasPro e comparate con i dati presenti nei database GenBank, utilizzando BLAST.

2.4 ANALISI STATISTICA

La realtà zootecnica rilevata tramite i questionari distribuiti agli allevatori e la situazione epidemiologica sono state inizialmente analizzate tramite una semplice statistica descrittiva.

In seguito si è proceduto ad analizzare l'influenza di determinati fattori nella maggiore o minore probabilità di presenza dell'infezione da piroplasmi. Nell'analisi dei fattori di rischio sono state prese in considerazione nove variabili diverse: *size* (allevamenti di dimensione medio-piccola; allevamento di grandi dimensioni, cioè quello della Missione), *location* (rurale per la Missione e un allevamento esterno; peri-urbana per gli altri sei allevamenti), *district* (Muheza per quattro allevamenti esterni; Korogwe per un allevamento; Zenneti per un allevamento esterno e per la Missione), età (animali con meno di un anno; da uno a tre anni; con più di tre anni), sesso, razza (locale; incrocio), utilizzo del pascolo, trattamento acaricida (sì: una volta a settimana; no: una volta al mese o mai), e ITM. La differenza di positività allo striscio e alla PCR tra i gruppi individuati dalle variabili appena elencate sono state analizzate tramite un approccio univariato utilizzando il test del Chi Quadrato di Pearson, mantenendo il limite di significatività statistica pari a $p < 0,05$.

3. RISULTATI

3.1 DESCRIZIONE DELLA REALTÀ ZOOTECNICA

Tutti gli allevamenti campionati sono staticamente classificati in “rurali”, “peri-urbani” o “urbani” in base alla distanza dalla cittadina più vicina. Questo fattore potrebbe influenzare, per esempio, la facilità di approvvigionamento degli acaricidi e dunque il loro utilizzo (Swai et al., 2005a). Un allevamento si definisce “rurale” se dista più di 15 km dal centro cittadino, “peri-urbano” se si trova periferico alla città ma entro un raggio di 15 km, e “urbano” se compreso nella città (Swai et al., 2005a). La Missione può essere classificata come “rurale” poiché dista 18 km dalla cittadina di Muheza. Gli allevamenti esterni si trovavano quasi tutti in zona peri-urbana, rispettivamente uno nel distretto di Korogwe e cinque in quello di Muheza, mentre uno solo era rurale, trovandosi, come la Missione, a più di 15 km di distanza dalla cittadina.

Dal questionario sottoposto ai sette allevatori della zona coinvolti nel progetto è emerso che sei di loro possedevano bovini di razza mista (es. Frisona-Zebu, o Frisona-Boran) tranne uno, la cui mandria era composta da animali di razza locale. Gli animali presenti nella Missione erano di razza mista, e discendevano da bovini di razza locale incrociate prevalentemente con Frisona.

Per quanto riguarda il trattamento acaricida, quattro allevatori hanno dichiarato di trattare gli animali una volta alla settimana, mentre due allevatori una volta al mese, e un allevatore non li trattava affatto. I Padri Passionisti trattavano gli animali con un prodotto acaricida (Dominex®) una volta a settimana. Tutti coloro che mettevano in pratica un trattamento, compresi i Padri Passionisti, utilizzavano il sistema *hand-spray*.

Tutti gli allevatori conoscevano la ECF e ne attribuivano perdite annue variabili (uno/due capi all'anno). Per questo motivo, due allevatori avevano vaccinato i propri capi con l'ITM. Tra gli altri, alcuni mettevano in pratica il solo controllo delle zecche e nei casi gravi si affidavano ad un veterinario statale. L'allevatore che non

faceva uso di acaricida possedeva una scorta di tetracicline, con le quali trattava all'occorrenza gli animali malati. La ECF è causa di perdite annuali anche per i Padri Passionisti, che, nonostante il trattamento settimanale, subiscono la perdita di 1-2 capi all'anno, perdita che è comunque contenuta grazie all'alto uso di trattamenti terapeutici messa in pratica (Butalex®).

Per alcuni dei proprietari esterni la prima occupazione non era l'allevamento, ma si trattava di funzionari o impiegati che nello spazio retrostante alla propria casa avevano costruito una piccola stalla per pochi capi. Questa situazione è molto diffusa, e permette ai proprietari di avere un'entrata economica integrativa grazie alla vendita di latte. Per questo motivo in queste realtà non si usano razze locali ma si preferiscono gli incroci. Uno degli aspetti negativi di questo sistema risiede nel fatto che spesso i proprietari non hanno le competenze e le conoscenze necessarie e stipendiano ragazzi e/o bambini per badare agli animali.

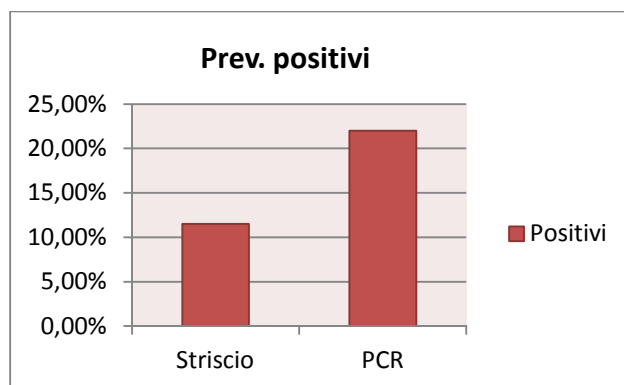
In questi casi, i bovini adulti erano tenuti a *"zero-grazing"*, cioè a posta fissa, mentre i vitelli in recinti, spesso con altri animali. Su sette allevamenti esterni, cinque mantenevano i propri capi in unità a *"zero-grazing"*. Al contrario, in due allevamenti esterni e nella Missione dei Padri Passionisti gli animali andavano al pascolo tutti i giorni.

3.2 EPIDEMIOLOGIA DESCRITTIVA

Su un totale di 123 animali campionati è stato possibile eseguire 122 esami microscopici (strisci di sangue), 37 test biomolecolari (PCR) su supporto Filterpaper Whatman®(FTA) e 100 su filtri in carta normale (CARTA). Su di un soggetto non è stato possibile valutare lo striscio di sangue perché gli eritrociti mostravano alterazioni morfologiche che rendevano difficile l'identificazione dei piroplasmi. La PCR invece è stata eseguita su tutti i campioni, da carta normale, da FTA o da entrambi. Infatti, 14 campioni sono stati analizzati sia in carta normale che in FTA, per valutare la concordanza tra i due supporti per PCR. I risultati dell'analisi biomolecolare vengono dunque riportati nell'insieme delle due analisi.

I risultati mostrano una prevalenza del 22,0% (27/123) alla PCR, più alta rispetto al 11,5% (14/122) riscontrata allo striscio di sangue, come evidenziato nel Grafico 1.

Grafico 1 - Prevalenza dei positivi allo striscio e alla PCR



Come illustrato in Tabella 3, 31 soggetti sul totale sono risultati positivi ad almeno uno dei due test diagnostici utilizzati, e 10 sono risultati positivi sia al vetrino che alla PCR. Al contrario, 17 campioni sono risultati positivi alla PCR ma non al vetrino, e 4 viceversa. La concordanza osservata è dell'82,8%. L'analisi del parametro K ha tuttavia evidenziato una concordanza debole ($K=0,397$).

Tabella 3 - Tavola di contingenza (striscio * PCR)

		PCR		Totale
		Neg	Pos	
Striscio	Neg	91	17	108
	Pos	4	10	14
Totale		95	27	122

I campioni sui quali è stata effettuata la PCR da entrambi i supporti (FTA e carta) sono 14, di cui 4 positivi e 5 negativi ad entrambi i test, 4 positivi all'FTA ma negativi dalla carta e 1 viceversa. I risultati sono riportati in Tabella 4. La concordanza osservata è del 64,3% e l'analisi del parametro K ha evidenziato una concordanza debole (K= 0,314).

Tabella 4 - Tavola di contingenza (PCR su FTA * PCR su carta)

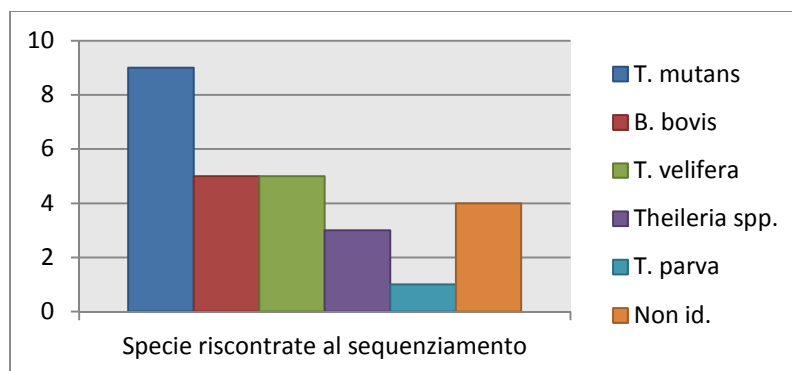
		PCR su CARTA		Totale
		Neg	Pos	
PCR su FTA	Neg	5	1	6
	Pos	4	4	8
Totale		9	5	14

Sui campioni positivi alla PCR (qualsiasi fosse il supporto utilizzato) si è proceduto con il sequenziamento. Su 27 sequenze effettuate, 4 sono risultate non attendibili e pertanto non si è ritenuto possibile arrivare ad una sicura identificazione, pur rimanendo considerate positive. Le specie risultanti dagli altri 23 campioni sono illustrate in Tabella 5, da sinistra a destra in ordine di maggior frequenza, e nel Grafico 2.

Tabella 5 – Specie riscontrate al sequenziamento

SPECIE RISCONTRATE (SEQUENZA)						
TOT POS	<i>T. mutans</i>	<i>B.bovis</i>	<i>T. velifera</i>	<i>Theileria spp.</i>	<i>T.parva</i>	n.i.
27	9	5	5	3	1	4
% relative	33%	19%	19%	11%	4%	15%

Grafico2 - Specie riscontrate al sequenziamento

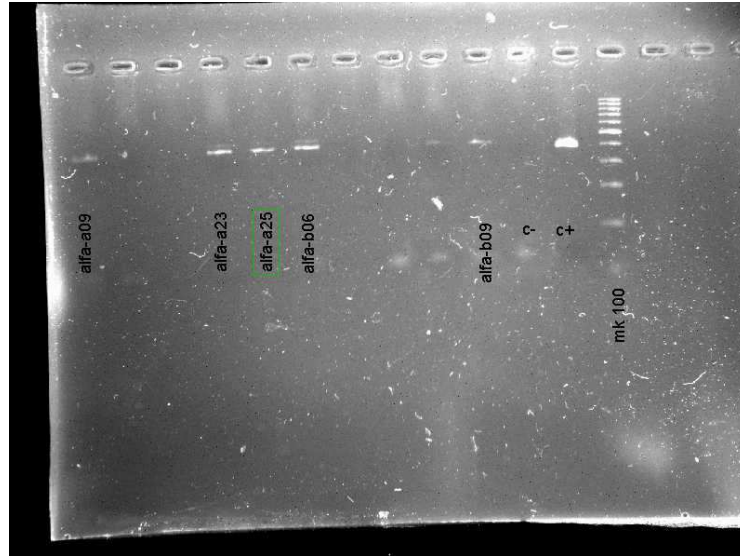


La specie, con *Accession Number* (Acc. N.) e origine geografica dell'isolato di riferimento registrato in GenBanke la relativa percentuale di identità, sono invece riportati in Tabella 6, per tutti i campioni positivi identificati.

Tabella 6 - Campioni su cui è stato fatto il sequenziamento

ID	SP.	% identità	Acc. n.	Origine
ALFA A 01	<i>T.mutans</i>	99%	AF078815	Sudafrica
ALFA A 09	<i>T.velifera</i>	99%	JN572705	Sudafrica
ALFA A 25	<i>T.mutans</i>	99%	AF078815	Sudafrica
ALFA B06	<i>T.mutans</i>	99%	AF078815	Sudafrica
ALFA B 09	<i>Theileria spp</i>	100%	JN572700	Sudafrica
ALFA B 20	<i>Theileria spp</i>	100%	JN572700	Sudafrica
ALFA C 01	<i>T.mutans</i>	99%	AF078815	Sudafrica
ALFA C 10	<i>B. bovis</i>	99%	L19077	Sudafrica
BETA A 01	<i>T.mutans</i>	99%	AF078815	Sudafrica
BETA A 05	<i>T.velifera</i>	96%	JN572705	Sudafrica
BETA A 06	<i>B. bovis</i>	97%	HQ264123	USA
BETA A 11	<i>T.mutans</i>	100%	FJ869898	Mozambico
BETA A 17	<i>T.velifera</i>	99%	JN572705	Sudafrica
BETA A 22	<i>T.mutans</i>	99%	FJ869899	Mozambico
BETA A 25	<i>B. bovis</i>	99%	L19077	Sudafrica
BETA A 26	<i>T.velifera</i>	100%	JN572705	Sudafrica
BETA A 31	<i>T.velifera</i>	98%	JN572705	Sudafrica
BETA B 07	<i>T.mutans</i>	96%	AF078815	Sudafrica
BETA B 11	<i>Theileria spp</i>	100%	JN572700	Sudafrica
BETA C 01	<i>T. parva</i>	100%	HQ684067	Sudafrica
BETA C 06	<i>B. bovis</i>	98%	L19078	Sudafrica
BETA C 10	<i>T.mutans</i>	99%	FJ869899	Mozambico
BETA C 11	<i>B. bovis</i>	98%	L19078	Sudafrica

Figura 10 - Piastra per PCR dopo la corsa elettroforetica, sono identificati i campioni positivi



La Figura 10 riporta una piastra di PCR con alcuni campioni positivi, tra cui i campioni ALFA A 25 e ALFA B 06 i cui ritrovamenti all'analisi microscopica sono riportati, rispettivamente, in Figura 11 e 12.

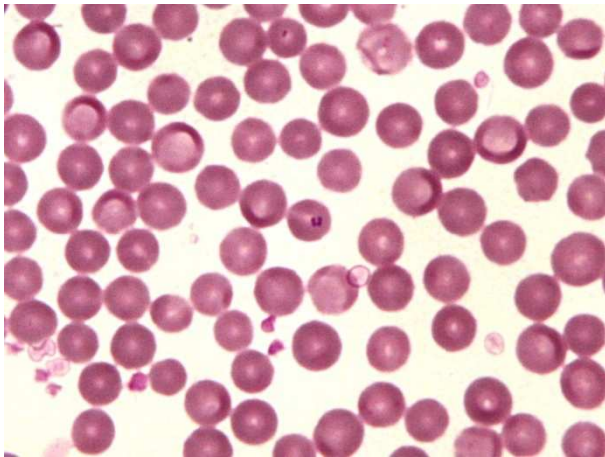


Figura 11 - Piroplasm
intraeritrocitari del campione
ALFA A 25 (*T. mutans*)

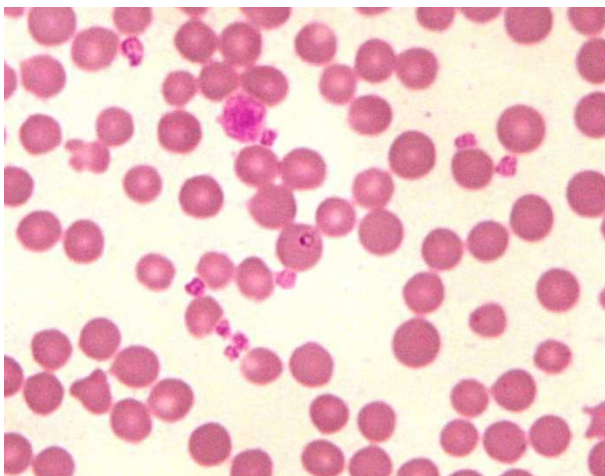


Figura 12 - Piroplasma
intraeritrocitario del
campioneALFA B 09 (*Theileria
spp.*)

Per quanto riguarda la sierologia, sono stati effettuati 20 test ELISA in cui si sono ricercati anticorpi nei confronti di *T. parva*, *T. mutans* e *B. bigemina*. Non è stato possibile testare gli anticorpi anche per *B. bovis* perché il test specifico per questo patogeno non era disponibile presso il laboratorio a cui ci si è rivolti. I risultati del test sierologico sono riportati in Tabella 7, e mostrano come la siero prevalenza più alta sia stata nei confronti di *T. mutans* (2/20, prevalenza del 10%), seguita da *T. parva* (1/20, prevalenza del 5%). Nessuno dei campioni è invece risultato positivo agli anticorpi per *B. bigemina*.

Tabella 7 – Risultati al test sierologico ELISA

Anticorpi	<i>T. mutans</i>	<i>T. parva</i>	<i>B. bigemina</i>
Esaminati	20	20	20
Positivi	2	1	0
Preval (%)	10%	5%	0%

3.3 ANALISI DEI FATTORI DI RISCHIO

La positività allo striscio di sangue è risultata indipendente da tutte le variabili prese in esame. I fattori risultati significativi riguardano solamente i risultati ottenuti con la PCR. Vengono di seguito riportate le tabelle di contingenza delle variabili che risultano influenzare la positività all'analisi biomolecolare in modo statisticamente significativo o vicino alla significatività: razza (Tabella 10), trattamento acaricida (Tabella 11), *district* (Tabella 12), *size* (Tabella 13) e *location* (Tabella 14).

Tabella 8 - Tavola di contingenza (RAZZA * PCR), $\chi^2 = 6,227$, $p = 0,013$

		PCR	N esam	N Pos	Prev (%)
RAZZA		Locale	18	8	44,4%
		Incroci	105	19	18,1%
		Totale	123	27	22,0%

Tabella 9 - Tavola di contingenza (TRATTAMENTO ACARICIDA * PCR), $\chi^2 = 3,849$, $p = 0,050$

		PCR	N esam	N Pos	Prev (%)
TRATTAMENTO ACARICIDA		No	36	12	33,3%
		Sì	87	15	17,0%
		Totale	123	27	22,0%

Tabella 10 - Tavola di contingenza (DISTRICT * PCR), $\chi^2 = 6,743$, $p = 0,034$

		PCR	N esam	N Pos	Prev (%)
DISTRICT		zenneti	74	12	16,2%
		muheza	31	7	22,6%
		korogwe	18	8	44,4%
		totale	123	27	22,0%

Come evidenziato nelle tabelle 8, 9 e 10, sono state registrate positività significativamente più alte negli allevamenti composti da razza locale, in quelli in cui non vengono messe in pratica sufficienti misure protettive contro le zecche e negli animali del distretto di Korogwe. Un allevamento in particolare rientra in tutte e tre

queste categorie (è anzi l'unico allevamento del distretto di Korogwe), ed è l'allevamento che presenta la positività alla PCR più alta: 33,3 % (6/18).

Le ultime due tabelle mostrano invece le differenze di positività tra l'allevamento della Missione (unico allevamento di grandi dimensioni campionato) e gli allevamenti medio-piccoli (quindi in quegli allevamenti considerati "esterni") e negli allevamenti che si trovano in zona peri-urbana rispetto a quelli rurali. Si tratta di differenze prossime alla significatività statistica.

Tabella 11 - Tavola di contingenza (SIZE * PCR), $\chi^2 = 3,304$, $p = 0,069$

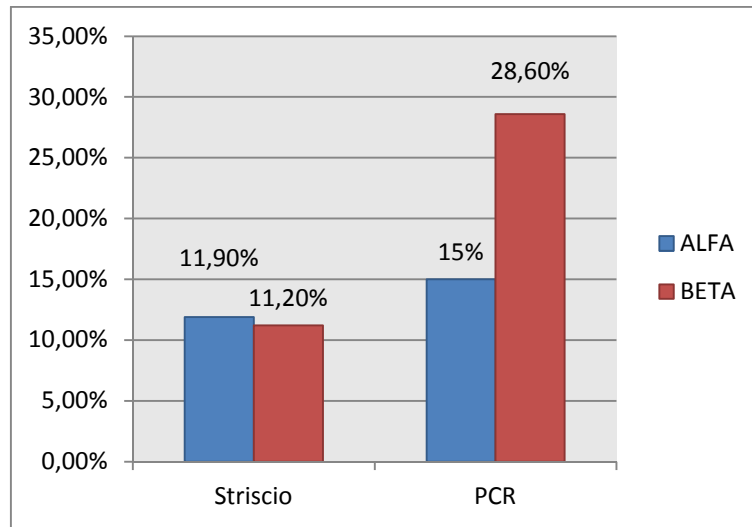
		PCR	N esam	N Pos	Prev (%)
SIZE		grandi dimensioni	60	9	15,0%
		medio-piccole dimensioni	63	18	28,6%
		Totale	123	27	22,0%

Tabella 12 - Tavola di contingenza (LOCATION * PCR), $\chi^2 = 3,566$, $p = 0,059$

		PCR	N esam	N Pos	Prev (%)
LOCATION		Rurale	74	12	16,2%
		peri-urbana	49	15	30,6%
		Totale	123	27	22,0%

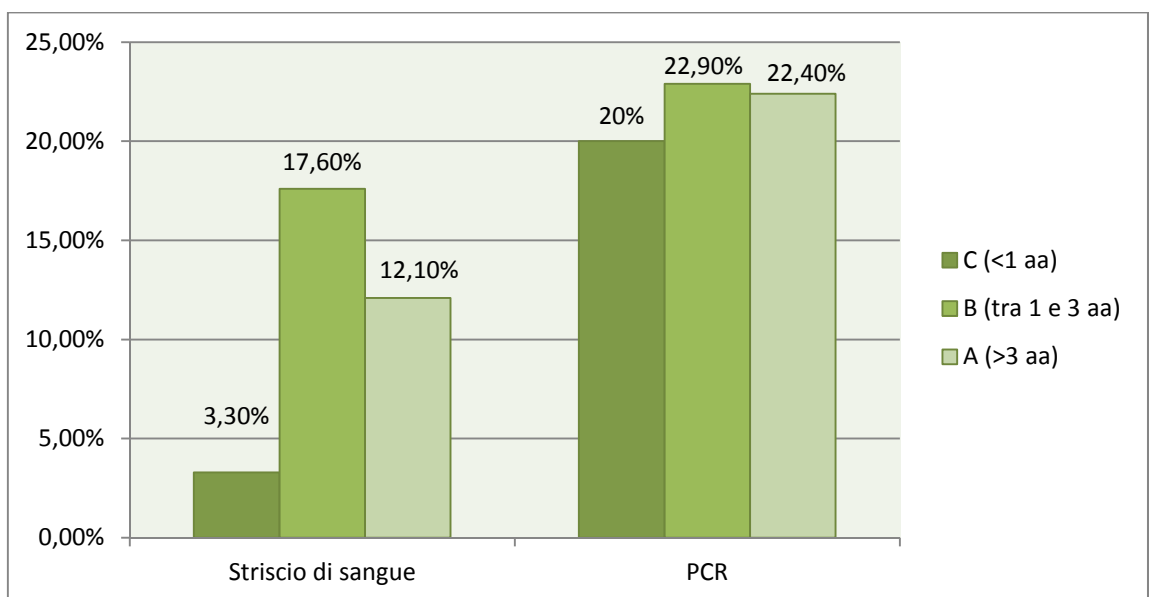
Nel confronto tra le due popolazioni campioni dalla quali si era partiti, quella interna alla Missione dei Padri (gruppo ALFA) e quella degli allevatori esterni (BETA), è stata evidenziata una minore prevalenza di positivi alla PCR nel gruppo ALFA rispetto al gruppo BETA, mentre tale differenza non è stata riscontrata all'analisi microscopica. In realtà tale suddivisione in gruppi ricalca una delle variabili considerate, vale a dire la dimensione degli allevamenti (*size*), dal momento che l'unico allevamento di grandi dimensioni è quello dei Padri Passionisti. Tale variabile era infatti risultata influenzare la positività dell'analisi biomolecolare in modo vicino alla significatività (Tabella 13). Di seguito è riportato invece il grafico con la distribuzione tra gruppo ALFA e gruppo BETA delle positività, all'esame biomolecolare e all'esame microscopico (Grafico 3).

Grafico 3 – Positività ai due test diagnostici tra gruppo ALFA e gruppo BETA



Inoltre, suddividendo i campioni positivi in classi di età, si evidenzia una minor prevalenza di positivi nella classe di vitelli allo striscio di sangue. Tuttavia, questa minore prevalenza non si manifesta alla PCR (Grafico 4), e all'analisi statistica è risultata non differire significativamente tra i gruppi per entrambi i test diagnostici utilizzati.

Grafico 4 – Positività ai due test diagnostici all'interno delle tre fasce d'età considerate



4. DISCUSSIONE

4.1 ASPETTI METODOLOGICI

I risultati della presente indagine epidemiologica mostrano una prevalenza maggiore all'esame biomolecolare (27/123, prev. 22%,) rispetto allo striscio di sangue (14/122, prev. 11,5%). Entrambi i metodi diagnostici sono risultati in grado di rilevare la presenza di piroplasmi. Tuttavia, la concordanza osservata tra i due test è definita debole dall'analisi del parametro K.

Infatti, dei 27 campioni positivi alla PCR, 17 erano risultati negativi allo striscio. Questa differenza conferma la migliore sensibilità del test biomolecolare sulla matrice sangue nei confronti dei piroplasmi, poiché riesce ad individuare anche soggetti portatori che, mostrando una bassa parassitemia, possono sfuggire al test microscopico. In aggiunta, il test microscopico è operatore-dipendente, ed è necessario un certo grado di esperienza per individuare con facilità i piroplasmi, mentre anche gli operatori più esperti riescono difficilmente a identificare con certezza la specie di piroplasma presente, differenziando tra loro anche le varie specie di *Theileria*. I piroplasmi possono inoltre confondersi con corpi inclusi eritrocitari (poco frequenti nel bovino), alterazioni eritrocitarie dovute a cattiva conservazione del campione oppure con altri parassiti intraeritrocitari, come *A. marginale*, che in ogni caso assume una forma tipicamente rotonda. Il vantaggio innegabile dell'analisi microscopica risiede nella praticità di utilizzo e nella possibilità di ottenere rapidamente dei risultati. La PCR, per quanto più sensibile e precisa, non è ancora applicabile in alcuni contesti carenti di strutture adeguate, come succede in buona parte del territorio tanzaniano.

Per quanto riguarda il confronto tra i due supporti utilizzati per la PCR, per valutarne l'efficacia si sono effettuate 14 PCR sia dalla carta sia dall'FTA, e il supporto Whatman® è risultato più sensibile poiché ha dimostrato la positività di quattro campioni risultati negativi invece per la carta, mentre per un solo campione

è avvenuto l'opposto. Ciò è giustificato dal fatto che il filtro Whatman® sia specifico per questo tipo di esami e studiato apposta per permettere una migliore conservazione del campione. Tuttavia, si è visto che anche il filtro in carta normale costituisce un supporto efficace per questo genere di test, e presi gli accorgimenti necessari per il suo utilizzo, può fornire un'alternativa economicamente valida ai filtri specifici.

L'ipotesi più verosimile è che, in caso di scarsa presenza di parassiti nel campione di sangue, il supporto in carta normale non conservi una sufficiente quantità di DNA evidenziabile alla PCR, mentre parassitemie più elevate siano rilevabili in modo comparabile dai campioni conservati con entrambi i supporti. Nel presente studio, il test biomolecolare è stato effettuato partendo da poche gocce di sangue prelevate da un grosso vaso ed utilizzate per allestire il supporto. Alcuni autori (Vos and Waal 2004; Bose et al., 1995) sconsigliano questo tipo di prelievo poiché affermano che i piroplasmi si concentrino nei capillari piuttosto che nel circolo generale. In futuro potrebbe essere interessante ritestare i due supporti cambiando il sito di prelievo (ad esempio utilizzando le vene auricolari).

4.2 ASPETTI EPIDEMIOLOGICI

Il sequenziamento dei campioni risultati positivi alla PCR ha fornito delle indicazioni più precise riguardo ai piroplasmi presenti nella zona. *T. mutans* è risultata la specie più frequente (9 casi su 23 sequenziati), ed insieme a *T. velifera* (5/23) fa parte delle theileriosi benigne poiché scarsamente patogene. Solo in animali immunodepressi, o nel caso di ceppi particolarmente patogeni, possono causare malattia clinica.

È dunque plausibile che, vista la scarsa pericolosità, questi parassiti possano circolare inosservati nella popolazione bovina. Un cenno va fatto alla particolare forma intraeritrocitaria che caratterizza *T. velifera* (da cui deriva il suo nome), che però non è stata riscontrata nei vetrini corrispondenti. Anzi, all'analisi microscopica

non si sono rilevate particolari differenze tra le specie poi indicate dal sequenziamento.

B. bovis è stata confermata in 5 casi (5/23), e rispecchia quanto affermano alcuni autori (Lynen et al., 2008; Zeman and Lynen, 2010) circa la costante diffusione di un nuovo vettore (*R. microplus*) in grado di trasmettere sia *B. bigemina* che *B. bovis*. Tuttavia, i casi clinici di babesiosi rimangono minoritari (almeno per quanto riguarda la Missione dei Padri Passionisti) rispetto alla ECF, probabilmente perché il controllo acaricida messo in pratica è efficace.

Un caso peculiare riguarda l'identificazione di una *T. parva* (1/23), che, sebbene largamente attesa, è stata ritrovata in un solo soggetto: un vitello appartenente ad un allevamento che aveva vaccinato tutti i capi con ITM (Infection and Treatment Method). In totale gli animali vaccinati con ITM rientrati in questo studio erano 16, e dei 4 che sono risultati positivi alla PCR solo per uno si è identificata *T. parva*. Gli altri 3 sono risultati positivi per *T. mutans* (2) e *T. velifera* (1). Inoltre, il soggetto con *T. parva* era un vitello di meno di un anno, che perciò aveva sicuramente ricevuto l'ITM da qualche mese, ed è dunque plausibile che l'origine di questa *Theileria* sia vaccinale. Ciò dimostra come l'ITM eviti la forma clinica della malattia ma non impedisca la circolazione del patogeno.

Infine, per una parte dei campioni risultati positivi alla PCR il sequenziamento non ha fornito dei risultati attendibili, ed è stato possibile valutare solo 23 sequenze su 27 positivi di partenza. Questo può essere legato al tipo di supporto utilizzato (non specifico) o al campione biologico dal quale si è estratto il DNA: il sangue. L'emoglobina presente infatti è un potente inibitore della Taq-polimerasi, e potrebbe aver inficiato sull'esito del sequenziamento.

Il test sierologico è stato eseguito su un numero di campioni inferiore rispetto al campione complessivo analizzato dallo studio, innanzitutto per le difficoltà economiche e logistiche incontrate nella spedizione dei campioni. Il laboratorio di riferimento per le analisi sierologiche è basato presso l'ILRI, a Nairobi, ed è stato possibile farvi pervenire i campioni solo grazie alla collaborazione di un veterinario italiano che opera nella zona, il Dr. Giuseppe di Giulio. Il test sierologico è stato

effettuato solamente sul siero di animali provenienti dalla Missione. Inoltre, il laboratorio non possedeva i materiali per ricercare gli anticorpi nei confronti di *B. bovis*, pertanto si è dovuto escludere questo test dall'analisi sierologica.

I risultati dell'analisi sierologica (ELISA) mostrano la maggiore prevalenza di anticorpi per *T. mutans* (2/20, prev. 10%), dato che rispecchia la situazione evidenziata dalla PCR e dal successivo sequenziamento. Un campione (1/20) è risultato positivo agli anticorpi per *T. parva* mentre nessun campione ha mostrato anticorpi per *B. bigemina*. Anche questi dati concordano con i dati emersi dalla PCR (solo una *T. parva* accertata e nessuna sequenza di *B. bigemina* identificata).

Studi precedenti nel settore degli *smallholder* attestavano la prevalenza di *T. mutans* e *T. parva*, rispettivamente, al 17% e 23% nella regione di Tanga (Swai et al., 2007a), e di *B. bigemina* e *B. bovis* al 27% e 6% (Swai et al., 2005b; Swai et al., 2007b). Inoltre chiarivano che la sieroprevalenza aumenta con l'età. Nel presente studio, a causa dell'esiguo campione e delle basse prevalenze, non è stato possibile stabilire delle correlazioni tra il risultato sierologico e le altre variabili prese in considerazione.

Il basso riscontro di positività per *T. parva* al sierologico può essere dovuto al trattamento acaricida che, evidentemente, riesce a limitare al minimo il contatto con le zecche. Inoltre, anche in caso di contatto con il patogeno, è dimostrato che il siero torni ad essere negativo se l'animale non è mantenuto in condizioni di *challenge* costante. La sieroprevalenza totale, per tutte le specie considerate, è risultata incompatibile con una situazione di stabilità endemica.

Nessun campione è risultato positivo a tutti e tre i test diagnostici, anzi 4 campioni positivi alla PCR hanno dato esito negativo al test sierologico. Tuttavia i risultati del sequenziamento per questi campioni indicavano una *T. velifera*, due *T. mutans* e un campione non definito di *Theileriaspp.*, perciò è plausibile che nel primo e nell'ultimo caso i test sierologici non fossero specifici per la specie poi riscontrata alla PCR, mentre questo discorso non è valido per i due campioni di *T. mutans*.

Per quanto riguarda il confronto tra i vari gruppi di animali, la presente indagine ha evidenziato come la positività più alta sia stata registrata negli allevamenti medio-

piccoli(quindi in quegli allevamenti considerati “esterni”), negli allevamenti in zona peri-urbana, in quelli composti da razza locale, negli allevamenti in cui non vengono messe in pratica sufficienti misure protettive contro le zecche e negli allevamenti del distretto di Korogwe. In realtà, esaminando i dati nel dettaglio, si nota un legame tra alcuni fattori di rischio ed uno solo degli allevamenti esterni presi in esame: l'allevamento di Korogwe. Questo allevamento presentava delle caratteristiche di gestione abbastanza diverse rispetto agli altri allevamenti campionati, quali la proprietà di soli bovini di razza locale e il non utilizzo del trattamento acaricida. I bovini di razza locale infatti sono naturalmente più resistenti all'infezione da piroplasma e per questo motivo il proprietario non riteneva necessario effettuare un trattamento periodico. Questo spiega l'alta prevalenza di positivi in questo allevamento rispetto agli altri. Il fatto che questo allevamento fosse l'unico a trovarsi nel distretto di Korogwe è, al contrario, puramente casuale. Purtroppo, la limitata dimensione del campione di allevamenti esterni coinvolti nell'indagine ha fatto sì che la presenza di questa realtà particolare abbia influenzato alcuni risultati all'analisi statistica.

Infine, sebbene considerata da molti autori (Swai et al., 2005b; Swai et al., 2007b) una variabile importante, nel presente studio non è emersa una correlazione tra positività e pascolo degli animali.

4.3 IL CONTROLLO INTEGRATO NELLA MISSIONE

La bassa prevalenza di *T. parva* (sia alla PCR che all'esame sierologico) concorda con l'assenza di casi di ECF nel periodo dello studio. Inoltre, il trattamento acaricida (Dominex®) ogni 7 giorni per *hand-spray* sembra funzionare.

Tuttavia, nell'area considerata, la malattia è presente tutto l'anno, con picchi di intensità a seconda delle piogge. Infatti, una stima della mortalità nel settore degli *smallholder* (Swai et al., 2010) indica che, nella regione di Tanga, il rischio di mortalità si aggira intorno al 8,5% all'anno, di cui il 45% per quanto riguarda i vitelli (animali con meno di 12 mesi) è legato alle TBD presenti nella zona (*Anaplasma marginale*, Babesiosi, *Ehrlichia ruminantium*) ma in particolar modo alla ECF.

Nella Missione si registra annualmente un aumento di incidenza nel periodo delle piogge primaverili (marzo-maggio), probabilmente per l'aumento del numero delle zecche e per l'inefficacia dei trattamenti acaricidi: gli animali vengono trattati ma, andando al pascolo l'acaricida viene lavato via dalla pioggia, perdendo così efficacia. In ogni caso, la bassa percentuale di animali siero-positivi riscontrata nello studio dimostra che il "challenge" da *T. parva* sia generalmente basso, e va ricordato che in animali adulti, sopra un anno, la presenza di anticorpi dura mediamente 5 mesi.

Un'opzione per il futuro potrebbe essere quella di intensificare il trattamento acaricida durante la stagione delle piogge, anche se il controllo delle zecche potrebbe comunque non essere garantito in periodi di piovosità eccezionale. Inoltre, questa opzione comporterebbe un aumento dei costi del controllo.

Una soluzione alternativa potrebbe consistere nell'introduzione dell'ITM nell'allevamento in parallelo alla riduzione del trattamento acaricida. Questo intervento richiederebbe un investimento economico non indifferente (la vaccinazione costa 8-10 dollari per capo, e la Missione possiede 170 animali), ma porterebbe ad un risparmio nel lungo periodo per via della diminuzione dei costi del trattamento acaricida. Attualmente, infatti, il costo del trattamento contro le zecche si aggira sui 12 euro per capo. Riducendo la frequenza di trattamento del

50% (come proposto da Kivaria et al., 2007), ed assumendo una diminuzione dei casi clinici (grazie all'introduzione dell'ITM), che attualmente vengono trattati con Butalex® a 17 euro circa la dose, il risparmio economico sarebbe notevole.

Bisogna però tenere presente dei rischi di questa seconda opzione e in particolare del fatto che in mancanza di un concomitante intervento vaccinale tramite ITM, la esclusiva diminuzione dei trattamenti per le zecche permetterebbe una maggiore circolazione del patogeno, molto rischiosa nelle zone in cui la ECF è endemica, a maggior ragione se si utilizzano animali incrociati con razze esotiche.

Pertanto, la vaccinazione ITM rappresenta l'alternativa più desiderabile dal punto di vista epidemiologico ed economico poiché permetterebbe, nel tempo, l'instaurarsi di una stabilità endemica (quantomeno all'interno della popolazione dell'allevamento) che garantirebbe la diminuzione dei danni economici, delle perdite di capi e degli sforzi necessari per il controllo rispetto alla situazione attuale.

5. CONCLUSIONI

Le piroplasmosi bovine sono presenti in Tanzania e nella regione di Tanga, ma ci sono poche informazioni disponibili, recenti e precise, circa la loro reale distribuzione, prevalenza ed importanza economica (Swai et al., 2007a). Di conseguenza, non è stato facile contestualizzare i risultati ottenuti dal presente studio. I dati raccolti mostrano una situazione di instabilità endemica per tutti i patogeni considerati, anche se va precisato che la prevalenza (soprattutto al test sierologico) è soggetta a variazioni stagionali consistenti (Gitau et al., 1999).

Inizialmente era stato ipotizzato di affiancare al progetto di indagine epidemiologica uno studio sulla presenza delle diverse specie di zecche nell'area della Missione, per meglio interpretare i risultati epidemiologici. Per motivi pratico-logistici non è stato possibile portare avanti questa ricerca (assenza di zecche negli animali della Missione durante il periodo di indagine). Inoltre, un maggior numero di campioni e di allevamenti avrebbe permesso di lavorare con dati più significativi.

La tesi voleva tuttavia essere un primo contatto con la realtà della Missione dei Padri Passionisti e con i piccoli-medi allevatori della zona, e, in quanto indagine preliminare in un territorio che non era mai stato indagato, ha raggiunto gli obiettivi prefissati, tra cui quello di descrivere la situazione epidemiologica delle piroplasmosi all'interno dell'azienda della Missione, comparandola con la realtà esterna, e quello di fornire indicazioni utili a migliorare la futura gestione della stessa.

La Missione di Zenneti è stata fondamentale per il supporto logistico fornito durante il lavoro. Dalla stessa Missione infatti sono stati acquistati il microscopio e la centrifuga necessari per l'analisi dei campioni. Più in particolare, Padre Roberto Dal Corso, l'attuale Padre Superiore della Missione di Zenneti, è stato il tutor incaricato di supervisionare il lavoro di campionamento ed analisi sia nella Missione che negli allevamenti esterni, prestandosi come interprete e guida. Il suo aiuto è stato indispensabile per questa tesi ed è grazie al suo impegno costante, unito

all'amore per gli animali, che la realtà di Zenneti costituisce il fiore all'occhiello tra le Missioni dei Padri Passionisti della Tanzania.

BIBLIOGRAFIA

- Altay K., Aydin M. F., Dumanli N., e Aktas M., (2008). Molecular detection of *Theileria* and *Babesia* infections in cattle. *Veterinary Parasitology*, 158(4), 295–301.
- Ardemagni A. I., Mambretti F. e Silvera G., (2004). Nsoe - Geografia Regionale. Milano: ed. Principato, seconda edizione; 118-139.
- Babes V., (1888). Sur l'hémoglobinurie bacterienne du boeuf. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences*, Ser. III Sci. vie 107, 692–694.
- Bock R., Kingston T.G. e de Vos A.J., (1999). Effect of breed of cattle on transmission rate and innate resistance to infection with *Babesia bovis* and *B. bigemina* transmitted by *Boophilus microplus*. *Australian Veterinary Journal*, 77 (7), 461-4.
- Bock R., Jackson L., De Vos A. e Jorgensen W., (2004). Babesiosis of cattle. *Parasitology*, 129(7), S247–S269.
- Böse R., Jorgensen W. K., Dalgliesh R. J., Friedhoff K. T., e De Vos A.J., (1995). Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. *Veterinary Parasitology*, 57(1-3), 61–74.
- Callow L.L., Dalgliesh R.J. e De Vos A.J., (1997). Development of Effective Living Vaccines Against Bovine Babesiosis - The Longest Field Trial? *International Journal for Parasitology*, 27 (7), 747-767.
- Coleman P.G., Perry B.D. e Woolhouse M.E.J., (2001). Endemic stability—a veterinary idea applied to human public health. *The Lancet*, 357 (9264), 1284-1286.
- Criado-Fornelio A., Martinez-Marcos A., Buling-Sarana A. e Barba-Carretero J.C., (2003). Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and Hepatozoon in southern Europe. Part II. Phylogenetic analysis and evolutionary history. *Veterinary Parasitology*, 114, 173–194.
- Cunningham M.P., Brown C.G.D., Burrige M.J. e Purnell R.E., (1973). Cryopreservation of infective particles of *Theileria parva*. *International Journal of Parasitology*, 3, 583-587.

- D'Haese L., Penne K. e Elyn R., (1999). Economics of theileriosis control in Zambia. *Tropical Medicine & International Health*, 4(9), A49–57.
- de Castro J.J., James A.D., Minjauw B., Di Giulio G.U., Permin A., Pegram R.G., Chizyuka G.B. e Sinyangwe P., (1997). Long-term studies on the economic impact of ticks on Sanga cattle in Zambia. *Experimental and Applied Acarology*, 21 (1), 3-19.
- De Vos A. J., Dalgliesh R. J. e McGregor W., (1986). Effect of imidocarb dipropionate prophylaxis on the infectivity and immunogenicity of a *Babesia bovis* vaccine in cattle. *Australian Veterinary Journal*, 63, 174–178.
- De Vos A.J., De Waal D. T., Jackson L.A., (1992). Bovine babesiosis. In *Infectious Diseases of Livestock*. Volume 1. 2nd edition. Ed. Coetzer J.A.W., Tustin R.C.. Southern Africa, Cape Town: Oxford University Press; 405-424.
- De Vos A.J., De Waal D.T., (2004). Bovine babesiosis, http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.02_bovine_babesiosis.pdf (Accesso: 20/03/2014).
- Di Giulio G., Lynen G., Morzaria S., Oura C. e Bishop R., (2008). Live immunization against East Coast fever - current status. Review. *Trends in Parasitology*, 25 (2), 85-92.
- Dolan T. T., (1999). Dogmas and misunderstandings in East Coast fever. *Tropical Medicine & International Health* 4 (9), A3–11.
- FAO, (2012)
<http://faostat.fao.org/site/573/DesktopDefault.aspx?PageID=573#ancor>
(Accesso: 7/05/2014)
- Gachohi J., Skilton R., Hansen F., Ngumi P., e Kitala P., (2012). Epidemiology of East Coast fever (*Theileria parva* infection) in Kenya: past, present and the future. *Parasites & Vectors*, 5(1), 194.
- Gitau G.K., Perry B.D., McDermott J.J., (1999). The incidence, calf morbidity and mortality due to *Theileria parva* infections in small-holder dairy farms in Murang'a District, Kenya. *Preventive Veterinary Medicine*, 39, 65–79.
- Gray C.E. e Robertson W., (1902). Report on Texas Fever or Redwater in Rhodesia. Argus Printing and Publishing, Cape Town (Citato da Dolan, 1999).

- Hay S., (2001). The paradox of endemic stability. *Trends in Parasitology*, 17 (7), 310.
- Herwaldt B.L., Cacciò S., Gherlinzoni F., Aspöck H., Slemenda S.B., Piccaluga P., Martinelli G., Edelhofer R., Hollenstein U., Poletti G., Pampiglione S., Löschenberger K., Tura S., Pieniazek N.J., (2003). Molecular characterization of a Non-*Babesia divergens* organism causing zoonotic Babesiosis in Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 9, 942–948.
- Jaetzhold, R., Schmidt, H., (1982). Farm Management Handbook of Kenya: Vol. 11, Part A and B. The Ministry of Agricultural and The German Agricultural Team (GAT), Nairobi.
- Kariuki D.P., Young A.S., Morzaria S.P., Lesan A.C., Mining S.K., Omwoyo P., Wafula J.L.M. e Molyneux D.H., (1995). *Theileria parva* carrier state in naturally infected and artificially immunised cattle. *Tropical Animal Health and Production*, 27 (1), 15-25.
- Kellerman T.S., Coetzer J.A.W. e Naude T.W., (1988). Plant poisonings and Mycotoxicoses of Livestock in Southern Africa. Cape Town: Oxford University Press Southern Africa.
- Kivaria F., Ruheta M., Mkonyi P., e Malamsha P., (2007). Epidemiological aspects and economic impact of bovine theileriosis (East Coast fever) and its control: A preliminary assessment with special reference to Kibaha district, Tanzania. *The Veterinary Journal*, 173(2), 384–90.
- Koch R., (1903). The cattle disease in Southern Rhodesia. *Transvaal Agricultural Journal*, 4, 122–117 (Citato da Dolan, 1999).
- Latif A. e Hove T., (2011). History and critical review of *Theileria parva* (Boleni), the vaccine stock against Zimbabwean cattle theileriosis. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 2(3), 163–7.
- Lawrence J.A., Norval R.A.I. e Uilenberg G., (1983). *Rhipicephalus zambeziensis* as a vector of bovine theileriae. *Tropical Animal Health and Production*, 15, 39-42.
- Lawrence J.A., Perry B.D., Williamson S.M., (1992a). East coast fever. In *Infectious Diseases of Livestock*. Volume 1. 2nd edition. Ed. Coetzer J.A.W., Tustin R.C.. Southern Africa, Cape Town: Oxford University Press; 447–467.

- Lawrence J.A., Perry B.D., Williamson S.M., (1992b). Corridor disease. In *Infectious Diseases of Livestock*. Volume 1. 2nd edition. Ed. Coetzer J.A.W., Tustin R.C.. Southern Africa, Cape Town: Oxford University Press; 468-471.
- Lawrence J.A., Perry B.D., Williamson S.M., (1992c). Zimbabwe theileriosis. In *Infectious Diseases of Livestock*. Volume 1. 2nd edition. Ed. Coetzer J.A.W., Tustin R.C.. Southern Africa, Cape Town: Oxford University Press; 472-474.
- Lawrence J.A. e Williamson S.M., (1992d). Turning sickness. In *Infectious Diseases of Livestock*. Volume 1. 2nd edition. Ed. Coetzer J.A.W., Tustin R.C.. Southern Africa, Cape Town: Oxford University Press; 475-477.
- Lawrence J.A. e Williamson S.M., (1992e). *Theileria taurotragi* infection. In *Infectious Diseases of Livestock*. Volume 1. 2nd edition. Ed. Coetzer J.A.W., Tustin R.C.. Southern Africa, Cape Town: Oxford University Press; 478-479.
- Lawrence J.A. e Williamson S.M., (1992f). *Theileria mutans* infection. In *Infectious Diseases of Livestock*. Volume 1. 2nd edition. Ed. Coetzer J.A.W., Tustin R.C.. Southern Africa, Cape Town: Oxford University Press; 480-482.
- Lynen G., Yrjö-Koskinen A., Bakunamwe C., Di Giulio G., Mlinga N., Khama I., Rushton J., (2012). East Coast fever immunisation field trial in crossbred dairy cattle in Hanang and Handeni districts in northern Tanzania. *Tropical Animal Health and Production*, 44(3), 567–72.
- Lynen G., Zeman P., Bakunamwe C., Di Giulio G., Mtui P., Sanka P., e Jongejan F., (2008). Shifts in the distributional ranges of *Boophilus* ticks in Tanzania: evidence that a parapatric boundary between *Boophilus microplus* and *B. decoloratus* follows climate gradients. *Experimental and Applied Acarology*, 44(2), 147–64.
- Mackenstedt U., Gauer M., Mehlhorn H., Schein E. e Hauschild S., (1990). Sexual cycle of *Babesia divergens* confirmed by DNA measurements. *Parasitology Research*, 76, 199–206.
- Marcotty T., Brandt J., Billiouw M., Chaka G., Losson B. e Berkvens D., (2002). Immunisation against *Theileria parva* in eastern Zambia: influence of maternal antibodies and demonstration of the carrier status. *Veterinary Parasitology*, 110(1-2), 45–56.

- Maritim A.C., Young A.S., Lesan A.C., Ndungu S.G., Stagg D.A. e Ngumi P.N., (1992). Transformation of *Theileria parva* derived from African buffalo (*Syncerus caffer*) by tick passage in cattle and its use in infection and treatment immunization. *Veterinary Parasitology*, 43(1-2), 1-14.
- Martins S.B., Giulio G. Di e Lynen G., (2010). Assessing the impact of East Coast Fever immunisation by the infection and treatment method in Tanzanian pastoralist systems. *Preventive Veterinary Medicine*, 97(3-4), 175–82.
- Mbwambo H., Magwisha H.B. e Mfinanga J.M., (2006). Evaluation of buparvaquone (BUTA-Kel KELA, Belgium) as a treatment of East Coast fever in cattle, in the peri-urban of Dar Es Salaam city, Tanzania. *Veterinary Parasitology*, 139(1-3), 67–73.
- Minjauw B. e Mcleod A., (2003). *Tick-borne diseases and poverty*. The impact of ticks and tick-borne diseases on the livelihood of small-scale and marginal livestock owners in India and eastern and southern Africa. UK: Research report, DFID Animal Health Programme, Centre for Tropical Veterinary Medicine, University of Edinburgh.
- Montenegro-James S., Benitez M.T., Leon E., Lopez R. e Ristic M., (1987). Parasitology Bovine babesiosis: induction of protective immunity. *Parasitology Research*, 74, 142-150.
- Morzaria S.P., (2014). FAO. <http://www.fao.org/wairdocs/ilri/x5549e/x5549e0t.htm> (Accesso: 1/05/2014).
- Mukhebi A.W., Perry B.D. e Kruska R., (1992). Estimated economics of theileriosis control in Africa. *Preventive Veterinary Medicine*, 12, 73–85.
- Musoke A., Morzaria S., Nkonge C., Jones E., e Nene V., (1992). A recombinant sporozoite surface antigen of *Theileria parva* induces protection in cattle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(2), 514–8.
- Nayel M., El-Dakhly K.M., Aboulaila M., Elsify A., Hassan H., Ibrahim E. e Yanai T., (2012). The use of different diagnostic tools for *Babesia* and *Theileria* parasites in cattle in Menofia, Egypt. *Parasitology Research*, 111(3), 1019–24.

- Norval R.A.I e Horak I. G., (1992). Vectors: Ticks. Infectious Diseases of Livestock. Volume 1. 2nd edition. Ed. Coetzer J.A.W., Tustin R.C.. Southern Africa, Cape Town: Oxford University Press; 3-40.
- Ogden N., Gwakisa P., Swai E., French N., Fitzpatrick J., Kambarage D. e Bryant M., (2003). Evaluation of PCR to detect *Theileria parva* in field-collected tick and bovine samples in Tanzania. *Veterinary Parasitology*, 112(3), 177–183.
- Phiri B.J., Benschop J., Stevenson M., Swai E.S. Karimuribo E.D., e French N.P., (2012). Spatiosurvival analysis of mortality on smallholder dairy farms in Tanga and Iringa regions of Tanzania. *Tropical Animal Health and Production*, 44(4), 827–34.
- Potgieter F.T., Stoltsz W.H., Blouin E.F. e Roos J.A., (1988). Corridor disease in South Africa: a review of current status. *Journal of the South African Veterinary Association*, 59, 155–160.
- Ravindran R., Mishra A.K. e Rao J.R., (2007). Slide enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Babesia bigemina* infection in bovines. *Veterinary Research Communications*, 31(8), 999–1004.
- Rechav Y., Clarke F.C. e Dauth J., (1991). Acquisition of immunity in cattle against the blue tick, *Boophilus decoloratus*. *Experimental and Applied Acarology*, 11, 51–56.
- Short N.J. e Norval R. A., (1981). Regulation of seasonal occurrence in the tick *Rhipicephalus appendiculatus* Neumann, 1901. *Tropical Animal Health and Production*, 13(1), 19–26.
- Singh H., Mishra A.K., Rao J. R. e Tewari K., (2009). Comparison of indirect fluorescent antibody test (IFAT) and slide enzyme linked immunosorbent assay (SELISA) for diagnosis of *Babesia bigemina* infection in bovines. *Tropical Animal Health and Production*, 41(2), 153–9.
- Smith T., (1893). Investigations into the nature, causation, and prevention of Texas or Southern cattle tick fever. *Bureau of Animal Industries*, Bulletin no. 1, U.S. Department of Agriculture, Washington, DC.
- Starcovici C., (1893). Bemerkungen über den durch Babes entdeck-ten Blutparasiten und die durch denselben hervorgebrachten Krakheiten, die seuchenhafte

- Hamoglobinurie des Rindes (Babes), dans Texasfieber (Th. Smith) und der Carceag der Schafe (Babes). *Zbl. Bakt.*, I. Abt. 14, 1–8.
- Stoltz W., (1989). Theileriosis in South Africa: a brief review. *Revue Scientifique et Technique, Office International des Epizooties*, 8(1), 93–102.
- Sutherst R.W. e Maywald G.F., (1985). A computerised system for matching climates in ecology. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 13, 281–299.
- Sutherst R. W., (1987). The dynamics of hybrid zones between tick (Acari) species. *International Journal for Parasitology*, 17(4), 921–926.
- Swai E.S., French N., Beauchamp G., Fitzpatrick J.L., Bryant M.J., Kambarage D., Ogden N.H., (2005a). A longitudinal study of seroconversion to tick-borne pathogens in smallholder dairy youngstock in Tanzania. *Veterinary Parasitology*, 131, 129–137.
- Swai E.S., French N.P., Karimuribo E.D., Fitzpatrick J.L., Bryant M.J., Browne P.E., Ogden N.H., (2005b). Spatial and management factors associated with exposure of smallholder dairy cattle in Tanzania to tick-borne pathogens. *International Journal for Parasitology*, 35, 1085–1096.
- Swai E.S., Karimuribo E.D., Kambarage D.M., Moshy W.E. e Mbise A.N., (2007a). A comparison of seroprevalence and risk factors for *Theileria parva* and *T. mutans* in smallholder dairy cattle in the Tanga and Iringa regions of Tanzania. *Veterinary Journal*, 174(2), 390–6.
- Swai E.S., Karimuribo E.D., French N.P., Fitzpatrick J.L., Bryant M.J., Kambarage D.M. e Ogden N.H., (2007b). Seroprevalence of *Babesia bigemina* in smallholder dairy cattle in Tanzania and associated risk factors. *Journal of the South African Veterinary Association*, 78 (1), 15-20.
- Tønnesen M.H., Penzhorn B.L., Bryson N.R., Stoltz W.H. e Masibigiri T., (2004). Displacement of *Boophilus decoloratus* by *Boophilus microplus* in the Soutpansberg region, Limpopo Province, South Africa. *Experimental and Applied Acarology*, 32(3), 199–208.
- Torr S., Eisler M., Coleman P., Morton J. e Machila N., (2002). Integrated control of ticks and TseTse. A Report for the DFID Advisory and Support Services Contract (Managed by NRI International Ltd) Project ZV0151; NRI code V0160.

- Uilenberg G., (1976). Tick-borne livestock diseases and their vectors. 2. Epizootiology of tick-borne diseases. *World Animal Review*, 17, 8–15.
- Uilenberg G., (1995). International collaborative research: significance of tick-borne hemoparasitic diseases to world animal health. *Veterinary Parasitology*, 57(1-3), 19–41.
- Uilenberg G., (1999). Immunization against diseases caused by *Theileria parva*: a review. *Tropical Medicine and International Health*, 4(9), A12–20.
- Uilenberg G., (2006). *Babesia* - a historical overview. *Veterinary Parasitology*, 138 (1-2), 3–10.
- Urquhart G.M., Armour J., Ducan J.L., Dunn A.M. e Jennings F.W., (1998). *Parassitologia Veterinaria*. Torino: UTET, 1998; 214-221; 287-294.
- Vial H. J. e Gorenflot A., (2006). Chemotherapy against babesiosis. *Veterinary Parasitology*, 138(1-2), 147–60.
- Walker A.R., Bouattour A., Camicas J.-L., Estrada-Peña A., Horak I.G., Latif A.A., Pegram R.G. e Preston P.M., (2003). *Ticks of domestic animals in Africa: a guide to identification of species*. Bioscience Reports, Edinburgh, UK (Revised 2007).
- Wesonga F.D., Orinda G.O., Ngae G.N. e Grootenhuis J., (2006). Comparative tick counts on game, cattle and sheep on a working game ranch in Kenya. *Tropical Animal Health and Production*, 38(1), 35–42.
- Wright I.G., Goodger B.V, Leatch G., Aylward J.H., Rode-Bramanis K. e Waltisbuhl D.J., (1987). Protection of *Babesia bigemina*-immune animals against subsequent challenge with virulent *Babesia bovis*. *Infection and Immunity*, 55(2), 364–8.
- Young A.S., Grocock C.M. e Kariuki D.P., (1988). Integrated control of ticks and tick-borne diseases of cattle in Africa. *Parasitology*, 96, 403–432.
- Zeman P. e Lynen G., (2010). Conditions for stable parapatric coexistence between *Boophilus decoloratus* and *B. microplus* ticks: a simulation study using the competitive Lotka-Volterra model. *Experimental and Applied Acarology*, 52(4), 409–26.

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio tutte le persone senza le quali questa tesi non sarebbe stata possibile: la mia famiglia, per avermi dato la possibilità di vivere questa esperienza africana; tutti gli amici e gli affetti che mi sono stati vicini durante il soggiorno in Missione e che mi hanno supportata durante la stesura della tesi; il mio relatore per aver appoggiato queste velleità da viaggiatrice, il Dr. Beppe Di Giulio per avermi illuminata nella confusione delle piroplosmi africane, e Cinzia del laboratorio di Malattie Parassitarie per non avermi fatto raccogliere tutti i coriandoli; mia sorella, la letterata, che ha dato la caccia agli scivoloni grammaticali; lo statistico per avermi ascoltata, consigliata e tranquillizzata in ogni momento con infinita pazienza; le mie compagne di avventura per non aver esitato a prendere il volo con me e soprattutto ringrazio tutti i volontari conosciuti in Tanzania e, ancora una volta, Padre Roberto Dal Corso, perché è bello sapere che, nel mondo, esistono ancora persone così.