



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI SASSARI  
DIPARTIMENTO DI MEDICINA VETERINARIA  
Corso di Dottorato di Ricerca in Scienze Veterinarie  
Indirizzo: Qualità e Sicurezza Alimentare  
XXXI CICLO

**Aggiornamenti sulle infezioni da protozoi  
negli ovini della Sardegna**

Relatore

**Prof. Antonio Varcasia**

Correlatore

**Prof. Antonio Scala**

Il coordinatore

**Prof.ssa Fiammetta Berlinguer**

Tesi di dottorato della

**Dr.ssa Claudia Tamponi**

## INDICE

	<b>Pag</b>
<b>INTRODUZIONE</b>	1
<b>1. GENERALITA' SULLE MALATTIE PROTOZOARIE DEGLI OVINI</b>	3
<b>1.1. <i>CRYPTOSPORIDIUM</i> SPP.</b>	3
1.1.1. Agente eziologico	3
1.1.2 Ciclo biologico	4
1.1.3 Fonti di contagio e trasmissione	5
1.1.4 Patogenesi e segni clinici	7
1.1.5 Criptosporidiosi nell'uomo	8
<b>1.2. <i>SARCOCYSTIS</i> SPP.</b>	12
1.2.1 Agente eziologico	12
1.2.2 Ciclo vitale	12
1.2.3 Fonti di contagio e trasmissione	14
1.2.4 Patogenesi e segni clinici	15
1.2.5 Sarcosporidiosi nell'uomo	16
<b>1.3 <i>GIARDIA DUODENALIS</i></b>	19
1.3.1. Agente eziologico	19
1.3.2 Ciclo biologico	20
1.3.3 Fonti di contagio e trasmissione	20
1.3.4 Patogenesi e segni clinici	22
1.3.5 Giardiosi nell'uomo	23
<b>2. PARTE SPERIMENTALE</b>	25
<b>2.1. FASE 1 - VALUTAZIONE DELLA PRESENZA DELLA CRIPTOSPORIDIOSI NEGLI OVINI DELLA SARDEGNA E IDENTIFICAZIONE DEI GENOTIPI CIRCOLANTI</b>	25

<b>2.1.1 Background</b>	25
<b>2.1.2 MATERIALI E METODI</b>	27
<b>2.1.2.1 Campionamento</b>	27
<b>2.1.2.2 Analisi microscopica</b>	28
<b>2.1.2.3 Indagine biomolecolare</b>	29
<b>2.1.3 RISULTATI</b>	31
<b>2.1.4 DISCUSSIONE</b>	32
<b>2.1.5 TABELLE E FIGURE</b>	35
<b>2.2. FASE 2 - EPIDEMIOLOGIA E CARATTERIZZAZIONE BIOMOLECOLARE DELLE FORME MACROSCOPICHE E MICROSCOPICHE DI <i>SARCOCYSTIS</i> NEGLI OVINI DELLA SARDEGNA</b>	38
<b>2.2.1. Background</b>	38
<b>2.2.2 MATERIALI E METODI</b>	39
<b>2.2.2.1 Sarcocisti macroscopiche</b>	39
<b>2.2.2.2 Sarcocisti microscopiche</b>	40
<b>2.2.3 RISULTATI</b>	42
<b>2.2.3.1 Sarcocisti macroscopiche</b>	42
<b>2.2.3.2 Sarcocisti microscopiche</b>	43
<b>2.2.4 DISCUSSIONE</b>	44
<b>2.2.5 TABELLE E FIGURE</b>	46
<b>2.3. FASE 3 - VALUTAZIONE DELLA PRESENZA DELLA GIARDIOSI NEGLI OVINI DELLA SARDEGNA E IDENTIFICAZIONE DEGLI ASSEMBLAGGI COINVOLTI NELLA MALATTIA OVINA</b>	48
<b>2.3.1 Background</b>	48
<b>2.3.2 MATERIALI E METODI</b>	49
<b>2.3.2.1 Campionamento</b>	49
<b>2.3.2.2 Analisi microscopica</b>	50
<b>2.3.2.3 Indagine biomolecolare</b>	50

<b>2.3.3 RISULTATI</b>	51
<b>2.3.4 DISCUSSIONE</b>	52
<b>2.3.5 FIGURE</b>	54
<b>CONCLUSIONI</b>	54
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	59

## **INTRODUZIONE**

Le zoonosi parassitarie sono considerate fra le malattie emergenti o ri-emergenti in tutto il mondo (Weiss, 2008), in virtù di vari fattori tra cui cambiamenti demografici, fenomeni culturali e comportamentali, turismo, immigrazione, surriscaldamento globale e inadeguate misure di sanità pubblica (CDC, 1994). In particolare le zoonosi protozoarie, a causa della elevata produzione di forme infettanti e della loro estrema resistenza a fattori climatici e ambientali, possono essere facilmente trasmesse con l'acqua e gli alimenti (Slifko et al., 2000) e per questo vengono definite *water-borne e food-borne diseases*.

Le cause del costante aumento di queste parassitosi sono da ricercarsi anche in diversi aspetti; fra i più importanti, è da annoverare l'aumento del consumo di alimenti crudi, tra cui pesce e crostacei, carne cruda o poco cotta e verdure fresche, che facilita la trasmissione di un gran numero di infezioni zoonotiche.

È inoltre particolarmente importante l'insorgenza di queste infezioni nei pazienti immunocompromessi, inclusi quelli con HIV/AIDS, trapiantati d'organo o in terapia immunosoppressiva per varie patologie (Prasad, 2010).

Tra le zoonosi parassitarie trasmesse attraverso l'acqua e gli alimenti spiccano quelle causate da protozoi, per frequenza e gravità delle rispettive ripercussioni sanitarie ed economiche, fra queste in particolare: Toxoplasmosi, Criptosporidiosi, Sarcocistosi e Giardiosi.

Sulla Toxoplasmosi negli ultimi dieci anni in Sardegna sono stati eseguiti numerosi studi, che hanno approfondito i diversi aspetti della patologia (Rinaldi e Scala, 2008; Natale et al., 2006;

Masala et al., 2003, 2007; Scala et al., 2008; Chessa et al., 2014; Pipia et al., 2018). Al contrario, per le altre zoonosi protozoarie menzionate, gli studi sono relativamente limitati sebbene tali protozoi siano stati inseriti nella lista FAO/WHO dei *food-borne parasites* che rappresentano un pericolo per l'uomo, ed in particolare *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp., al quinto e undicesimo posto in ordine di importanza (FAO/WHO, 2014). Sempre nell'isola, la Criptosporidiosi è stata indagata soltanto per quanto riguarda la sua presenza nei bovini (De Vega et al., 2011) e nei molluschi bivalvi (Tedde et al., 2013). Allo stesso modo la Giardiosi è stata studiata limitatamente alla sua presenza nel cane (Pipia et al., 2014) e nei molluschi bivalvi (Tedde et al., 2013). La Sarcosporidiosi infine, è stata oggetto di studio negli ovini (Scala et al., 2008) e nei cinghiali (Leoni et al., 1995) della Sardegna.

Per questo motivo, l'obiettivo del presente lavoro è approfondire la conoscenza dal punto di vista epidemiologico e tassonomico di Criptosporidiosi, Sarcosporidiosi e Giardiosi negli ovini della Sardegna, allo scopo di meglio definire le eventuali ripercussioni zootecniche e zoonosiche di tali infezioni nel territorio.

La ricerca è stata focalizzata sulla specie ovina in quanto questa rappresenta in Sardegna il settore zootecnico di maggior rilievo socio-economico. Gli ovini della Sardegna costituiscono un terzo del patrimonio ovino italiano, con 12.300 aziende ed un totale di 3.300.450 capi (Istat, 2016). In particolare, verrà valutata la presenza della Criptosporidiosi negli ovini e verranno identificati i genotipi circolanti (Fase 1), verrà aggiornata inoltre l'epidemiologia e la caratterizzazione molecolare delle specie di *Sarcocystis* macroscopiche e microscopiche (Fase 2) e infine verrà condotta un'indagine epidemiologica sulla Giardiosi (Fase 3).

Inoltre, prima della parte sperimentale, abbiamo ritenuto importante introdurre una review di quanto finora noto su queste infezioni protozoarie negli animali e nell'uomo.

## **1. GENERALITA' SULLE MALATTIE PROTOZOARIE DEGLI OVINI**

### **1.1. CRYPTOSPORIDIUM SPP.**

#### **1.1.1. Agente eziologico**

*Cryptosporidium* spp. è una causa frequente di diarrea nell'uomo e negli animali in tutto il mondo, specialmente in soggetti giovani o immunocompromessi. Contro i criptosporidi non si dispone ancora di una terapia del tutto efficace (Bouzid et al., 2013).

Il genere *Cryptosporidium* (Tyzzer, 1907) comprende più di 30 specie che infettano mammiferi, uccelli, marsupiali e animali poichilotermici. Appartiene al Phylum “Apicomplexa” (Levine, 1979), Classe “Sporozoa” (Leukart, 1879), Sottoclasse “Coccidiasina” (Leukart, 1879), Ordine “Eucoccidiorida” (Leger e Duboseq, 1910), Sub-ordine “Eimeriorina” (Leger, 1911), Famiglia “Cryptosporidiidae” (Léger, 1911).

Tutte le specie conosciute di *Cryptosporidium* presentano un ciclo evolutivo diretto monoxeno e hanno alcune caratteristiche che li differenziano da gli altri coccidi: presentano oocisti senza sporocisti e con quattro sporozoiti, formano anche oocisti a pareti sottili che consentono l'autoinfezione e presentano un vacuolo parassitoforo nella cellula ospite a localizzazione intracellulare, ma extracitoplasmatico.

*C. parvum* rappresenta la specie di maggiore interesse per le sue caratteristiche di infettività, morbilità e mortalità in diverse specie animali e soprattutto, per la capacità di sostenere infestazioni zoonotiche spesso fortemente debilitanti nell'uomo e che possono portare anche alla morte dei soggetti immuno-compromessi (Genchi, 2001).

*C. parvum* è una specie cosmopolita capace di infettare un numero elevato di mammiferi domestici e selvatici (Xiao, 2010; Ryan et al., 2014; Abeywardena et al., 2015). *C. parvum* e *C. hominis* rappresentano le principali specie zoonotiche ed hanno assunto col tempo un'importanza sempre maggiore per la sanità pubblica (Xiao, 2010, Šlapeta, 2013). *C. ubiquitum* rappresenta una specie cosmopolita che viene considerata generalista in quanto rilevata in un alto numero di mammiferi domestici e selvatici, tra cui l'uomo (Šlapeta, 2013); sebbene abbia un'ampia distribuzione, la

gamma dei suoi possibili ospiti non è ancora del tutto conosciuta (Santín et al., 2007; Fayer et al., 2010).

Per quanto riguarda la sua patogenicità, *C. ubiquitum* è stato isolato in campioni fecali di diverse specie animali, come pecore, capre e istrici (Díaz et al., 2010, 2015; Šlapeta, 2013), senza tuttavia determinare segni clinici rilevabili in nessuna delle specie animali studiate (Fayer et al., 2010). Inoltre, sebbene questa specie abbia un potenziale zoonosico e sia considerata emergente, i casi riportati nell'uomo sono scarsi per cui, attualmente, si ritiene che la sua importanza nella sanità pubblica sia ridotta (Santín et al., 2007; Chalmers et al., 2009; Šlapeta, 2013).

All'interno della specie *C. parvum* sono presenti 14 sottotipi, identificabili a livello biomolecolare attraverso l'amplificazione dei geni che codificano per una glicoproteina da 60kDa (GP60) e che vengono identificati come IIa-IIo. Alcuni di questi sottotipi sono esclusivi del genere umano (IIc), mentre altri, come il IIa e il IIo sono segnalati prevalentemente negli animali, sebbene siano riscontrati in gran parte anche in infezioni umane, presentando un elevato potenziale zoonotico (Xiao, 2010; Wang et al., 2014).

Allo stesso modo all'interno della specie *C. ubiquitum*, il gene GP60 permette di distinguere 6 famiglie alleliche, identificate come XIIa-XIIi. Il sottotipo XIIa è quello più comunemente riscontrato negli ovini e caprini in tutto il mondo, mentre nell'uomo sono stati identificati i sottotipi XIIa-XIId (Li et al., 2014).

### 1.1.2 Ciclo biologico

Il ciclo biologico di *Cryptosporidium* spp è di tipo monoxeno (o diretto) e tutte le fasi della moltiplicazione, sia sessuale che asessuale, si svolgono nello stesso ospite (Smith and Rose, 1998).

*Cryptosporidium* spp nelle varie fasi del ciclo presenta diversi stadi: sporozoite, trofozoite, schizonte, merozoite, microgamete, macrogamete, zigote ed oocisti.

La fase endogena inizia quando un ospite recettivo ingerisce le oocisti sporulate, di solito attraverso cibo o acqua contaminati. L'oocista rappresenta il solo stadio esogeno, ha dimensioni molto piccole (4-4,5 µm), contiene 4 sporozoit, viene escreta tramite le feci dall'ospite infetto e il doppio strato della parete le conferisce un'elevata resistenza nell'ambiente esterno. Il protozoo replica sulla superficie della cellula epiteliale intestinale invadendone l'orletto a spazzola ma restando a livello extra-citoplasmatico, all'interno di un vacuolo parassitoforo in una sorta di fagocitosi (Fayer, 2007). Quando le oocisti giungono in sede intestinale, gli sporozoit si liberano ed invadono il bordo dei microvilli degli enterociti, dove ha luogo la fase schizogonica (o asessuata) del loro sviluppo. Evolvono in meronti di tipo I contenenti 4-8 merozoit liberi nel lume intestinale, che possono dare



origine ad altri meronti di tipo I oppure possono continuare nello sviluppo dando origine a meronti di tipo II che proseguiranno a loro volta con la divisione cellulare, formando 4 merozoiti di tipo II in grado di infettare ognuno un enterocita. La schizogonia termina quando i merozoiti di tipo II danno origine a gametociti maschi e femmine (micro- e macrogametociti), che si differenziano in macrogameti femminili e micro gameti maschili. La fecondazione avviene attraverso la penetrazione di un solo microgamete, liberato in seguito alla rottura della cellula ospite, all'interno di un macrogamete con la successiva fusione dei due nuclei. Lo zigote, così formatosi, evolve in oocisti, contenenti 4 sporozoiti ciascuna, che sporulano in situ e che verranno espulse con le feci (Mariano e Nardi 2014). La maggior parte delle oocisti (circa l'80%) forma una parete spessa e resistente, a due strati, ed abbandona l'ambiente endozoico con le feci, ed essendo altamente resistente alle condizioni ambientali, è la forma da cui l'infezione può diffondersi (Sréter e Varga, 2000; Xiao et al., 2004; Smith et al., 2007; Xiao e Fayer, 2008). Oltre a questo tipo di oocisti, un altro gruppo sviluppa una sottile parete a singolo strato, che di solito si frammenta non appena le oocisti lasciano gli enterociti, liberando così i quattro sporozoiti. Questi ultimi invadono nuove cellule epiteliali e danno inizio a un nuovo ciclo, provocando un'autoinfezione (Current, 1985; Current and Reese, 1986; Current et al., 1988).

### **1.1.3 Fonti di contagio e trasmissione**

Sono state descritte varie vie di trasmissione con cui le oocisti di *Cryptosporidium* spp. possono passare da un ospite infetto a un altro recettivo, e quella principale è certamente quella oro-fecale, in seguito all'ingestione di oocisti infettanti eliminate. Questa modalità include il contatto diretto tra gli ospiti (animale-animale, animale-uomo, uomo-uomo) e indiretto attraverso l'acqua (sia essa di bevanda, superficiale, ad uso ricreativo), nonché attraverso altri alimenti contaminati (Cacciò, 2005, Nichols, 2007). Altre forme di veicolazione, come quella aerea (Chalmers et al., 2009) o il trasporto meccanico di oocisti da parte di mosche e altri insetti, sono state dimostrate sperimentalmente (Graczyk et al., 2000).

Lo studio dei dati epidemiologici ha mostrato una stretta correlazione tra l'insorgenza di casi nell'uomo e il contatto con animali parassitati (Fayer et al., 2000). L'allevamento, in particolar modo di ruminanti domestici (Huetink et al., 2001), è stato correlato alla comparsa di focolai di criptosporidiosi umana (Mahdi e Ali, 2002; Robertson, 2009). Vari studi suggeriscono che l'inquinamento ambientale sia la via indiretta di infezione più diffusa, in modo che gli ospiti si infettino principalmente attraverso cibo e acqua. Le oocisti eliminate con le feci, possono contaminare acque superficiali o depositi (Frost and Muller, 1999, Machado et al., 2006),

aumentando enormemente la possibilità di raggiungere un gran numero e varietà di ospiti (Laberge et al., 1996).

*Cryptosporidium* spp. è per diffusione il primo tra i protozoi trasportati dall'acqua (waterborne) segnalati in tutto il mondo tra il 2004 e il 2010 (60,3%) (Baldursson e Karanis, 2011). Per tal motivo, l'Organizzazione Mondiale della Sanità lo ha identificato come patogeno di riferimento per la valutazione della qualità dell'acqua potabile (Medema et al., 2006). Questo perché le oocisti di *Cryptosporidium* spp. sono estremamente resistenti a diversi trattamenti delle acque, compresa la clorazione; si diffondono facilmente con tale matrice e sono difficili da eliminare dall'acqua potabile. *Cryptosporidium* spp. è stato identificato quale agente causale di numerosi focolai di gastroenterite trasmesse tramite il consumo di acqua potabile e con attività ricreative acquatiche (Smith et al., 1998; Baldursson and Karanis, 2011), confermando l'importanza di questa via nella trasmissione del protozoo. Anche i viaggi all'estero sono stati riconosciuti tra i fattori di rischio per le infezioni da *Cryptosporidium*, attraverso il consumo di cibo o acqua (Hunter et al., 2004), probabilmente a causa della scarsa igiene degli alimenti in paesi a emergenti, *Cryptosporidium* rientra infatti tra i patogeni responsabili della cosiddetta “diarrea del viaggiatore” (Goodgame, 2003).

Insetti, tra cui mosche e coleotteri (Szostakowska et al., 2004) ma anche nematodi a vita libera (Huamanchay et al., 2004) possono veicolare e diffondere oocisti di *Cryptosporidium* spp. sulle superfici delle piante commestibili.

La contaminazione dell'ambiente rimane uno dei fattori più importanti che determinano la frequenza dell'infezione nei ruminanti (Díaz et al., 2014). I vitelli infetti possono eliminare fino a 10 milioni di oocisti per grammo di feci durante la fase acuta della malattia, andando a costituire la principale fonte di contagio negli allevamenti; il che, considerate le basse dosi infettanti necessarie (10-100 oocisti), facilita la diffusione e il perpetuarsi della malattia (Diaz et al., 2014). L'estrema resistenza delle oocisti a condizioni ambientali avverse è un altro fattore di grande interesse epidemiologico. Le oocisti possono rimanere infettanti nell'ambiente per 2-6 mesi a 4°C; fino a tre mesi a temperature di 25-30°C, sei mesi a 20°C o sette mesi a 15°C (Anderson, 1985; Fayer et al., 1998), sono però molto sensibili all'essiccazione, al congelamento (24 ore a -18° C) e alle alte temperature (5 secondi a 70°C) (Fujino et al., 2002; García-Sánchez et al., 2014). Hanno inoltre un'elevata resistenza alla disinfezione chimica e non vengono inattivate dalla maggior parte dei disinfettanti domestici e industriali, come cloro, iodofori al 4%, cloruro di benzalconio al 10% o cresoli al 5% (Xiao et al., 2004).

Pertanto, è stato dimostrato che la presenza di *Cryptosporidium* spp. è direttamente correlata alla scarsa igiene delle strutture e alla gestione impropria degli animali. A questo proposito, diversi studi hanno messo a punto strategie igieniche e manageriali con lo scopo di ridurre il rischio di criptosporidiosi: pavimenti facilmente lavabili che facilitino l'asportazione del materiale fecale (cemento o rete), l'uso quotidiano di disinfettanti, la pulizia accurata dell'area per i parti e l'uso di box individuali per i neonati (Castro-Hermida et al., 2002a, Vergara e Quílez, 2004, Diaz et al., 2010c, García-Meniño et al., 2014). Anche le dimensioni del gregge rappresentano un fattore condizionante la presenza dell'infezione, in particolare negli animali adulti, probabilmente a causa della eccessiva densità di animali in questa categoria, con la conseguenza di una più elevata carica parassitaria ed una minore possibilità di praticare vuoto sanitario (Díaz et al., 2014).

#### **1.1.4 Patogenesi e segni clinici**

Le infezioni da *Cryptosporidium* spp. sono state associate, nella maggior parte dei paesi del mondo, alla presenza di processi gastroenterici nei ruminanti domestici, specialmente nei neonati (Muñoz-Fernández et al., 1996, de Graaf et al., 1999). Questo parassita è attualmente considerato una delle principali cause di diarrea neonatale in vitelli, agnelli e bambini (de Graaf et al., 1999, Lundborg et al., 2005, Diaz et al., 2014, García-Meniño et al., 2015).

L'azione patogena di *Cryptosporidium* spp. è dovuta alla moltiplicazione attiva del protozoo nelle cellule epiteliali della parte terminale del digiuno e dell'ileo, che causa una distruzione rapida e numerosa delle stesse, ed esita in atrofia, fusione e riduzione della lunghezza dei villi intestinali, riducendo in modo considerevole la superficie di assorbimento (Fayer, 2008). Questi mutamenti causano una riduzione nel processo di assorbimento e digestione dei nutrienti che da luogo all'insorgenza di diarrea, che varia da moderata ad acuta e porta spesso a disidratazione (Anderson, 1981, Fayer e Ungar, 1986, Diaz et al., 2014; Certad et al., 2017). Altri segni clinici associati con l'infezione protozoaria includono anoressia, algia addominale, apatia, depressione e perdita di peso (Casey, 1991, De Graaf et al., 1999, Lefay et al., 2001); sono riportati anche casi di infezione asintomatica (Anderson, 1989, Ongerth e Stibbs, 1989, McCluskey et al., 1995). Gli eventi più gravi sono caratterizzati da un'eccessiva perdita di fluidi ed elettroliti che determina un'acidosi metabolica, che può essere fatale in alcune circostanze (De Graaf et al., 1999). La sintomatologia si protrae per 3-12 giorni ed è caratterizzata dall'eliminazione di numerose oocisti (Casemore et al., 1997).

La criptosporidiosi induce perdite economiche significative nel settore zootecnico: oltre alle perdite dirette legate alla mortalità animale, vi sono altre perdite meno evidenti come la stentata crescita

degli animali che superano la malattia, a cui vanno aggiunti i costi dei trattamenti e le spese veterinarie (Díaz et al., 2014).

L'insorgenza e la gravità della sintomatologia dipendono da fattori intrinseci all'animale strettamente correlati al suo stato immunitario (età, stato nutrizionale) e altri fattori legati alle condizioni ambientali e gestione delle aziende agricole (Morin et al., 1976, Moon et al., 1978, Acres et al., 1979, Radostits and Acres, 1983, Waltner-Toews et al., 1986a-d). Tutti i fattori che riducono la resistenza dell'animale all'infezione favoriranno la comparsa della criptosporidiosi. Gli animali appena nati sono più ricettivi alle infezioni da *Cryptosporidium* spp., forse perché il loro sistema immunitario è ancora immaturo (Ortega-Mora e Wright, 1994; Santín et al., 2004; Maddox-Hyttel et al., 2006; Roy et al., 2006; Starkey et al., 2006). È stato dimostrato che gli anticorpi colostrali, sebbene non proteggano completamente dall'infezione nei ruminanti neonati, ne riducono la gravità ed aumentano la resistenza degli animali ad altri patogeni enterici (Fayer et al., 2008). Maggiore morbilità e condizioni più gravi sono state osservate in caso di insufficiente assunzione di colostro, oppure di scarsa qualità dello stesso; situazione comune nei vitelli nati da vacche di primo parto, che di solito producono meno colostro e di qualità inferiore (Kelly e Coutts, 2000; Díaz et al., 2014; García-Meniño et al., 2014; Arsenopoulos et al., 2017; Costa et al., 2017; Gelsing e Heinrichs, 2017; Novo et al., 2017). Inoltre, tutte le condizioni e situazioni stressanti, come un'inadeguata alimentazione, il sovraffollamento o la stabulazione di animali in strutture scarsamente ventilate e umide, aumentano anche significativamente il rischio di contrarre la malattia (Díaz et al., 2014). Infine, nell'insorgenza della diarrea, sono implicati fattori correlati agli altri enteropatogeni (protozoi, batteri, virus). Alcuni ceppi del protozoo hanno virulenza più elevata e causano processi più gravi; inoltre sono molto frequenti le infezioni multiple, che di solito sono associate a processi ingravescenti (García-Meniño et al., 2014, 2015).

### **1.1.5 Criptosporidiosi nell'uomo**

I primi casi di criptosporidiosi nell'uomo risalgono a metà degli anni '70 (Meisel et al., 1976, Nime et al., 1976), ma gli studi più importanti sono stati effettuati dagli anni '80, a seguito del verificarsi di numerosi casi di criptosporidiosi in individui infettati dal virus dell'immunodeficienza umana (HIV) (Ma e Soave, 1983; Navin e Juranek, 1984; Pitlik et al., 1983).

L'uomo si infetta attraverso la via oro-fecale nel contatto da animale a uomo o da uomo a uomo, mediante esposizione a acqua o terra contaminata durante attività ricreative (piscine e parchi pubblici), o mediante consumo di acqua e cibo contaminati. L'infezione è anche frequentemente associata a viaggi in paesi emergenti (Smerdon et al., 2003).

La gravità delle infezioni varia a seconda delle specie coinvolte; per le specie zoonotiche, la dose necessaria per determinare l'infezione nel 50% dei pazienti (DI50) è stimata in circa 10-83 oocisti per *C. hominis* e 132 per *C. parvum* (DuPont et al., 1995; Okhuysen et al. al., 1998; Chappell et al., 2006).

Le epidemie di criptosporidiosi nel Regno Unito verificatesi negli anni '90 sono state definite ad andamento bimodale (Meinhardt et al., 1996), con picchi in primavera e in autunno. I picchi primaverili sono stati attribuiti alla stagione dei parti negli allevamenti ovini e bovini, combinati con un'alta piovosità, che ha portato al deflusso del protozoo dai terreni agricoli alle acque superficiali e ai bacini di acqua potabile; mentre i picchi autunnali sono stati attribuiti al periodo di ritorno dai viaggi estivi delle persone verso paesi con maggiore incidenza (Meinhardt et al., 1996).

Si sono registrati nel tempo diversi episodi di “foodborne outbreak” legati al consumo di alimenti contaminati da *Cryptosporidium*, e la causa non sempre è intrinseca all'alimento, ma in alcuni casi deriva dalla sua scorretta manipolazione e o dalla mancata applicazione di norme igieniche (Robertson e Chalmers, 2013). Rientrano in questa categoria i casi in cui vegetali crudi, in particolare l'insalata, sono stati identificati come veicolo di criptosporidiosi (Pönka et al., 2009; Long et al., 2002). Numerosi casi si sono verificati anche in seguito al consumo di latte non pastorizzato e contaminato da *Cryptosporidium* (Gelletlie et al., 1997; Harper et al., 2002).

*Cryptosporidium* è stato talvolta riscontrato in specie acquatiche quali crostacei, molluschi bivalvi (vongole, ostriche, cozze, tartufi di mare) (Freire-Santos et al., 2000; Giangaspero et al., 2005), ad ulteriore conferma della elevata resistenza delle oocisti in ambiente acquatico, queste sono state riscontrate in molluschi bivalvi anche dopo due settimane di depurazione (Gomez-Couso et al., 2003).

Il dato tuttora più preoccupante sulla criptosporidiosi è rappresentato dall'elevato numero di casi associati alla frequentazione di piscine e ambienti acquatici (Yoder et al., 2008), se si considera la resistenza delle oocisti alla clorazione dell'acqua e il fatto che per contaminare una piscina intera è sufficiente una sola persona positiva (Pedraza-Diaz et al., 2001).

La criptosporidiosi colpisce tutte le fasce d'età, ma soprattutto ha un grande impatto sui bambini e sugli individui immunodepressi (HIV, chemioterapia o trapianti d'organo). La malattia è stata rilevata principalmente nei bambini sotto i 2 anni di età (Fayer e Ungar, 1986; Current e García, 1991) e negli anziani (Jaggi et al., 1994; Neill et al., 1996), così come nelle persone che sono entrate in contatto con bambini e/o animali giovani o che hanno consumato acqua dalla scarsa qualità igienica (Xiao e Ryan, 2008; Chalmers et al., 2009).

Nelle persone immunocompetenti, l'infezione è auto-limitante e decorre, nella maggior parte dei casi in modo asintomatico. In caso di comparsa, i segni clinici possono essere di grado variabile: dopo un periodo di incubazione di circa 3-12 giorni, si registra un episodio di diarrea acquosa che può durare tra 6 e 14 giorni (sono descritti casi in cui si è protratto sino a 1 mese), durante i quali i pazienti possono manifestare anche affaticamento, perdita di appetito, vomito e dolore addominale (MacKenzie et al., 1994; Bushen et al., 2007). Sono stati osservati anche la comparsa di dolore articolare e oculare, emicranie ricorrenti, capogiri e affaticamento, molto più frequenti nelle infezioni da *C. hominis* che in quelle causate da *C. parvum* (Hunter et al., 2004). I pazienti immunodepressi sono particolarmente sensibili alle infezioni (Gentile et al., 1991), che possono risultare talvolta fatali (Chalmers and Davies, 2010) a causa della disidratazione determinata dalla diarrea cronica (Cacciò, 2005; Chen et al., 2005; Bouzid et al., 2013). In alcuni casi è stata descritta l'estensione dell'infezione ad aree extraintestinali come fegato e dotti biliari (Denkinger et al., 2008; Wolska-Kusnierz et al., 2007) o ai polmoni (Meinhardt et al., 1996; Kibbler et al., 1987).

La criptosporidiosi è una delle principali infezioni secondarie nei malati di HIV, nei quali è stata correlata ad un aumentato rischio di morte (Peng et al., 1997). Nei pazienti immunodepressi e nei bambini sono descritte notevoli differenze nelle manifestazioni cliniche a seconda della specie/sottotipo di *Cryptosporidium* coinvolti, infatti i segni clinici causati da *C. hominis* (in particolar modo alcuni sottotipi), risultano più gravi di quelli causati da *C. parvum* (Xiao, 2010); mentre negli adulti immunocompetenti non si osservano differenze nei sintomi derivanti da infezioni da *C. parvum*, *C. hominis* o *C. meleagridis* (Chappell et al., 2011). Pertanto, per avere una reale misura del rischio per la salute pubblica, è importante l'identificazione appropriata delle specie e i genotipi di *Cryptosporidium*, per la quale è essenziale l'uso di tecniche di biologia molecolare (Morgan et al., 1999), che sono risultate un utile strumento per chiarire la tassonomia delle specie di *Cryptosporidium* (Monis and Thompson, 2003; Thompson and Monis, 2004; Xiao et al., 2004; Caccio et al., 2005; Ryan et al., 2016); così come, per determinare il loro potenziale zoonotico e stabilire le vie di trasmissione (Xiao e Ryan, 2004; Cacciò, 2005).

Allo stato attuale, il ruolo svolto da alcuni animali da reddito e da compagnia nella trasmissione della criptosporidiosi umana non è ancora del tutto chiaro. Diversi studi di subgenotipizzazione suggeriscono che alcune delle infezioni da *C. parvum* hanno origine nell'uomo stesso, mentre altre specie e/o genotipi comuni negli animali colpiscono in misura minore le persone (Xiao et al., 2004; Xiao and Feng, 2008).

La maggior parte dei casi di criptosporidiosi nell'uomo sono causati da *C. hominis* e *C. parvum*. Recenti studi molecolari affermano che la trasmissione di *C. hominis* è fondamentalmente

antroponotica, mentre quella di *C. parvum* è zoonotica (Chalmers e Katzer, 2013). L'importanza e la distribuzione di ciascuna di queste specie dipende dalla situazione geografica. *C. hominis* è più prevalente (62%) in America, Australia e Africa, mentre *C. parvum* è responsabile di un numero elevato di casi in Europa (57%), specialmente nel Regno Unito (Cacciò et al., 2005). Inoltre, mentre nelle aree urbane predominano i casi da *C. hominis*, le persone che vivono nelle aree rurali, soprattutto i bambini, hanno tassi più alti di infezione da *C. parvum*, si registravano probabilmente in relazione ad un maggiore contatto con gli animali (Llorente et al., 2007; Essid et al., 2008; Cacciò et al., 2013).

Solo recentemente *C. ubiquitum*, precedentemente noto come "genotipo del cervo o genotipo 3", emerge come un'altra importante specie infettante l'uomo (Fayer et al., 2010). È stato trovato in infezioni umane in tutto il mondo, principalmente nei paesi industrializzati (Chalmers e Katzer, 2013; Elwin et al., 2012). Il recente riconoscimento di *C. ubiquitum* come zoonosi emergente ha una grande importanza per la salute pubblica a causa della sua ampia distribuzione geografica e della vasta gamma di ospiti che può infettare (Fayer et al., 2010; Li et al., 2014). È stata infatti rilevata in agnelli (Diaz et al., 2015), ruminanti selvatici, roditori, procioni, lemuri e nell'uomo (Feng et al., 2007; Ziegler et al., 2007; Da Silva et al., 2003; Elwin e Chalmers, 2008; Fayer et al., 2010). È stato anche isolato in fonti di acqua potabile, raccolte di acqua piovana e liquami in diverse aree geografiche (Zhou et al., 2003; Jiang et al., 2005; Jellison et al., 2009; Nichols et al., 2010; Van Dyke et al., 2012).

Sebbene *C. hominis* e *C. parvum* siano responsabili della maggior parte delle infezioni nell'uomo, occorre prestare attenzione anche alla criptosporidiosi causata da *C. meleagridis*, *C. felis* e *C. ubiquitum*, anche se sono stati descritti solamente in casi sporadici (Llorente et al., 2007), in particolare nei bambini (Llorente et al., 2007; Cardona et al., 2011).

Altri studi suggeriscono l'esistenza di popolazioni di *C. parvum* specifiche per l'uomo (Cacciò, 2005); questo genotipo è stato rilevato e caratterizzato in numerosi focolai di criptosporidiosi trasmessi dall'acqua potabile o acqua ad uso ricreativo (MacKenzie et al., 1994; Peng et al., 1997; Ong et al., 1999; Xiao et al., 2001; Glaberman et al., 2002; Ryan et al., 2005; Baldursson and Karanis, 2011).

## 1.2. SARCOCYSTIS SPP.

### 1.2.1 Agente eziologico

I componenti/membri del genere *Sarcocystis* (Apicomplexa, Eimerinae, Coccidea, Sarcocystidae) (Dubey, 1988) sono tra i più comuni parassiti protozoari della muscolatura striata degli animali da reddito tra cui bovini, ovini e caprini (Mirzaei Dehaghi et al., 2013). Il ciclo biologico di questi parassiti si svolge obbligatoriamente tra due ospiti con i carnivori che fungono da ospiti definitivi mentre gli erbivori ed onnivori (domestici o selvatici) ne rappresentano gli ospiti intermedi (Tenter, 1995; Dubey, 2015).

Il genere *Sarcocystis* (Lankester, 1882) comprende più di 100 specie che infettano mammiferi, uccelli, marsupiali e animali poichilotermici. Appartiene al Phylum “*Apicomplexa*” (Levine, 1979), Classe “*Sporozoasida*” (Leukart, 1879), Sottoclasse “*Coccidiasina*” (Leukart, 1879), Ordine “*Eucoccidiorida*” (Leger e Duboseq, 1910), Sub-ordine “*Eimeriorina*” (Leger, 1911), Famiglia “*Sarcocystidae*” (Poche, 1913) (Dubey J.P., 1989).

*Sarcocystis* ha un ciclo vitale a due ospiti preda-predatore obbligato.

*Sarcocystis* fu repertato per la prima volta nel 1843 in un ratto domestico (*Mus musculus*) in Svizzera (Miescher, 1843). Solo 20 anni dopo il parassita venne riscontrato nella muscolatura di un suino (Kühn, 1865). Tuttavia il nome *Sarcocystis* venne introdotto solo alla fine del secolo (Labbé, 1899), e la specie rinvenuta nel suino (*Sarcocystis miescheriana*) divenne la specie tipo di questo parassita (Levine, 1986). Il ciclo vitale di *Sarcocystis* rimase sconosciuto fino al 1972, quando venne scoperto che due ospiti erano coinvolti nella trasmissione (Rommel e Heydorn, 1972; Rommel et al, 1972).

### 1.2.2 Ciclo vitale

*Sarcocystis* ha un ciclo vitale preda-predatore.

Le fasi asessuali si sviluppano solo nell'ospite intermedio, che, in natura, è spesso un animale preda, mentre quelle sessuali si sviluppano solo nell'ospite definitivo, che è carnivoro. Le specie di *Sarcocystis* hanno generalmente maggior specificità per i loro ospiti intermedi che per i loro ospiti definitivi; per *S. cruzi*, ad esempio, il bovino e il bisonte sono gli unici ospiti intermedi, mentre i cani, i lupi, i coyote, i procioni, gli sciacalli e le volpi possono fungere da ospiti definitivi (Dubey e Lindsay, 2006).

*S. cruzi*, segnalata anche nel nostro Paese (Poglayen et al 1980) funge da esempio in quanto il suo ciclo vitale è interamente noto. L'ospite intermedio si infetta attraverso l'ingestione di oocisti o sporocisti presenti nel cibo o nell'acqua. Le oocisti sporulate hanno una parete sottile (< 1 µm), che



spesso va incontro a rottura, rilasciando le sporocisti nel lume intestinale, da cui passano poi nelle feci. In sede intestinale, la parete della sporocisti si disgrega per azione della tripsina e della bile liberando 4 sporozoiti, i quali attraversano la parete intestinale, portandosi nelle cellule endoteliali delle arteriole di tutto l'organismo, dove avvengono diversi cicli di sviluppo asessuale (merogonia o schizogonia). Gli schizonti di prima generazione sono presenti nelle cellule endoteliali delle arterie 7-15 giorni dopo l'inoculazione. Gli schizonti di seconda generazione (contenenti i merozoiti alla periferia) compaiono da 19 a 46 giorni dopo l'inoculazione, prevalentemente in capillari in tutto il corpo. I merozoiti si trovano nelle cellule mononucleate del sangue periferico da 24 a 46 giorni dopo l'inoculazione (Dubey e Lindsay, 2006). Gli schizonti si dividono per endoduogenia, moltiplicazione asessuata in cui il nucleo diventa lobulato e si divide in due nuclei (Dubey, 1989). I merozoiti liberati dall'ultima generazione vascolare iniziano la formazione delle sarcocisti nelle appropriate cellule ospiti. Il merozoite intracellulare, che è circondato da un vacuolo parassitoforo (VP), diventa rotondo e in seguito ovoidale (metrocita) e subisce ripetute suddivisioni, producendo molti metrociti che dividendosi producono zoiti a forma di banana chiamati bradizoiti (o cistozoiti) lunghi 12-17  $\mu\text{m}$  che rappresentano le forme responsabili della trasmissione dell'infezione all'ospite definitivo. Le sarcocisti mature possono contenere alcuni metrociti disposti in periferia oltre ai bradizoiti.

Lo stadio infettante per il predatore ospite definitivo è rappresentato dalla sarcocisti matura, contenente un gran numero di bradizoiti. Le sarcocisti diventano generalmente infettanti circa 75 giorni dopo l'infezione, ma vi è una considerevole variabilità tra le specie. Le sarcocisti immature contenenti solo metrociti non sono infettanti per l'ospite definitivo (Dubey e Lindsay, 2006). Quando quest'ultimo ingerisce tessuti contenenti sarcocisti mature, i bradizoiti liberati in seguito alla digestione gastrica e intestinale penetrano nella mucosa dell'intestino tenue e si trasformano in gameti maschili (micro) e femminili (macro). Dopo la fecondazione di un macrogamete con un microgamete, la parete si sviluppa attorno allo zigote e si forma l'oocisti. L'intero processo di gametogonia e fecondazione si completa entro 24 ore (Dubey e Lindsay, 2006). Le oocisti di *Sarcocystis* sporulano direttamente nella lamina propria. I periodi di prepatenza e patenza sono variabili, ma per la maggior parte delle specie di *Sarcocystis*, sporocisti (più raramente oocisti già sporulate) compaiono nelle feci da 7 a 14 giorni dopo l'ingestione delle sarcocisti (Dubey, 1989). La sarcocisti (dal greco Sarkos=carne; Kystis=vescica) rappresenta lo stadio terminale asessuale del genere *Sarcocystis* e costituisce un importante criterio identificativo in quanto per lungo tempo la classificazione delle varie specie si è basata esclusivamente sulla loro struttura.

Il numero e la distribuzione delle sarcocisti nell'organismo dell'ospite varia considerevolmente da un ospite all'altro ed in base al numero di sporocisti ingerite, alla specie di *Sarcocystis* coinvolta, alla specie ospite, ed allo stato immunitario dello stesso. Sebbene la maggior parte delle sarcocisti si sviluppi nella muscolatura striata di cuore, lingua, esofago, diaframma e muscoli scheletrici, alcune sarcocisti sono state rinvenute nella muscolatura liscia (anche *S. cruzi* e *S. tenella*). Sarcocisti sono state osservate anche nelle SNC e nelle fibre del Purkinje di cuore e fasci muscolari, ma in numero più limitato (Dubey, 1989).

### **1.2.3 Fonti di contagio e trasmissione**

L'ospite intermedio contrae l'infezione attraverso l'ingestione delle sporocisti che contaminano le acque di bevanda e i pascoli. Le sporocisti possono permanere nella lamina propria ed essere escrete per periodi molto prolungati, inoltre sono molto resistenti e possono sopravvivere nell'ambiente esterno fino a 1,5-2 anni (Boch et al., 1980; Dubey, 1989). Possono essere inoltre trasportate da vettori passivi quali mosche e altri insetti (Markus, 1980). Oocisti e sporocisti sono resistenti ai comuni disinfettanti e al congelamento, per cui possono trascorrere l'inverno sul pascolo mantenendo intatta la loro infettività; mentre possono essere inattivate dall'essiccamento o dall'esposizione a temperature di 56°C per 10 minuti (Dubey et al., 1989).

In considerazione della elevata incidenza di infezioni asintomatiche osservate in sede di macellazione è evidente che questa parassitosi rappresenta la norma laddove cani e gatti vivono a contatto con ruminanti o altri ospiti intermedi del parassita o siano in grado di contaminare con le feci mangimi e foraggi. In rari casi è stata documentata l'infezione transplacentale in bovini e ovini, con l'evidenziazione di schizonti nei feti abortiti. Il fatto che non sia mai stato riscontrato il protozoo in agnelli e vitelli neonati, fa supporre che l'infezione transplacentale abbia sempre esito fatale. *Sarcocystis* è invece stato trovato in un puledro di 3 giorni (Cunningham, 1973).

La possibilità di trasmissione galattogena di *Sarcocystis* attraverso il latte o il colostro è stata studiata in infezioni sperimentali, ma senza successo (Fayer et al., 1982). Pertanto l'ingestione di sarcocisti mature contenenti bradizoiti è l'unica via di infezione per l'ospite definitivo. L'immunità in seguito a ripetute infezioni è scarsa o assente, per cui ad ogni pasto di carne infetta può seguire un nuovo ciclo di produzione di sporocisti (Fayer, 1977; Heydorn e Rommel, 1972).

#### 1.2.4 Patogenesi e segni clinici

La sintomatologia nell'ospite intermedio varia a seconda della specie colpita, normalmente si hanno modeste manifestazioni cliniche apparenti che possono sfociare in eventi eclatanti in determinate situazioni (animali defedati, particolarmente stressati, etc.) o in seguito ad infezioni sperimentali.

Generalmente, le specie trasmesse dai canidi sono patogene, mentre spesso non lo sono quelle trasmesse dai felidi. *S. cruzi*, *S. capracanis* e *S. tenella* sono rispettivamente le specie più patogene per bovini, capre e pecore (Dubey e Lindsay, 2006).

Nel bovino la sarcocistosi decorre solitamente asintomatica, ma in infezioni gravi in animali non immunizzati precedentemente possono apparire febbre, anoressia, anemia, dimagrimento, zoppia, aborti e diarrea (Radostits et al., 2008). In alcuni casi sono stati osservati sintomi neurologici quali atassia, tremori, debolezza muscolare, opistotono, scialorrea, cecità e nistagmo (Radostits et al., 2008; Smith e George, 2009).

Gli ovini colpiti possono diventare ipereccitabili presentare scialorrea ed aree alopeciche nel collo e nella groppa; si può assistere a sintomatologia nervosa quali posizione supina, opistotono, nistagmo, andatura ciclica ed in alcuni casi il decesso (Casarosa 1985), generalmente riconducibili a *S. tenella* e *S. arieticanis* (Radostits et al., 2008). Si possono altresì evidenziare numerose formazioni cistiche macro e microscopiche a livello muscolare. *S. ovis*, *S. ovifelis* possono causare nelle pecore gravide aborto (Leek et al., 1976, 1978) e nei giovani agnelli il decesso (Leek et al., 1977; Smith e George, 2009). Ozmen et al. (2004) riportano una sindrome neurologica nell'agnello detta "sarcocistosi encefalitica" caratterizzata da depressione, incoordinazione, paralisi degli arti posteriori e coma.

I sintomi clinici sono evidenti generalmente durante il secondo ciclo schizogonico nei vasi sanguigni (fase acuta). Da 3 a 4 settimane dopo un'infezione con elevate dosi di sporocisti (50.000 o più), compaiono febbre, anoressia, anemia, emaciazione e perdita del pelo (in particolare sulla groppa e la coda) e alcuni animali possono venire a morte.

Lesioni patologiche molto gravi sono presenti negli animali che muoiono durante la fase acuta, caratterizzate comunemente da edema, emorragie, atrofia del grasso e necrosi focale nei linfonodi intestinali. Le emorragie sono più evidenti sulla sierosa dei visceri, nel muscolo cardiaco, nei muscoli scheletrici e nella sclera degli occhi. Tali lesioni possono variare da petecchie a ecchimosi di diversi centimetri di diametro. Le lesioni microscopiche possono essere osservate in molti organi e consistono in necrosi, edema e infiltrazioni di cellule mononucleate. Durante la fase cronica, le lesioni sono limitate ai muscoli e consistono in una miosite non suppurativa con degenerazione delle sarcocisti. La miosite eosinofila (ME) è una condizione infiammatoria specifica dei muscoli

striati, principalmente attribuibile ad accumuli di eosinofili (Dubey, 1989; Wouda et al., 2006). È stata riscontrata principalmente nei bovini, occasionalmente negli ovini e raramente in suini ed equini. Gli animali colpiti sono di solito clinicamente normali e le lesioni da ME sono scoperte durante l'ispezione della carne dopo la macellazione. Le alterazioni patologiche consistono in aree di colore da verde a giallo pallido che possono essere estese fino a 15 cm. La patogenesi della ME non è chiara e le lesioni non sono mai state riscontrate in infezioni sperimentali (Dubey e Lindsay, 2006). Le sarcocisti degenerative si trovano in sezioni di lesioni da ME (Wouda et al., 2006).

### **1.2.5 Sarcosporidiosi nell'uomo**

All'interno del ciclo vitale di *Sarcocystis* spp., l'uomo può fungere sia da ospite definitivo sia da ospite intermedio. In seguito all'ingestione di carne cruda o poco cotta contenente sarcocisti di *S. hominis* (da carne bovina) e *S. suihominis* (da carne suina) può contrarre una sarcocistosi intestinale (Fayer et al., 2015), caratterizzata da una sintomatologia gastrointestinale con nausea, mal di stomaco ed enteriti acute o croniche con diarrea, che variano considerevolmente a seconda del numero di cisti ingerite e che appaiono più gravi in caso di *S. suihominis*. L'escrezione di sporocisti con le feci avviene dopo 10-15 giorni dall'ingestione di carne infetta (Dubey et al., 1989; Fayer et al., 2015) e talvolta si protrae per diversi mesi (Plotkowiak e Klasa, 1973; Li e Lian, 1986), in un'infezione sperimentale in Olanda si è protratta per 21 mesi (Laarman, 1962). La sarcocistosi intestinale è stata segnalata in tutto il mondo, ad eccezione dell'Africa e dei Paesi del Medio Oriente, in cui per motivi religiosi e culturali è inusuale il consumo di carne cruda (Fayer et al., 2015). La maggior parte dei casi sono stati riportati in Paesi Europei quali Olanda (Laarman, 1962; Tadros et al., 1979, Germania (Janitschke, 1974; 1975; Flentje et al., 1975), Polonia (Plotkowiak, 1973; 1976), Slovacchia (Giboda e Rakàr, 1978) e Spagna (Clavel et al., 2001), altri casi sono stati riportati in Asia, Australia, Argentina e Brasile (Deluol et al., 1980; Bunyaratvej et al., 1982; Velàsquez et al., 2001; Li et al., 2004; 2007)

L'uomo può fungere inoltre da ospite intermedio aberrante, con sviluppo di una sarcocistosi muscolare, nel caso in cui sostituisca accidentalmente l'ospite naturale. Non è noto il numero di specie per le quali l'uomo può rappresentare l'ospite intermedio, ma si pensa possano essere almeno sette in quanto in bibliografia sono riportati almeno altrettanti diversi tipi strutturali di sarcocisti (Beaver et al., 1979; Dubey et al., 1989, Fayer et al., 2015). L'uomo è stato identificato quale ospite intermedio nell'infezione da *S. nesbitti* (Lau et al., 2014; Italiano et al., 2014; Esposito et al., 2014), specie per la quale non è ancora noto con certezza l'ospite definitivo, sebbene sembra trattarsi con molta probabilità di un serpente o altri rettili (Yang et al., 2005; Tian et al., 2012).

L'unica via di trasmissione è quella orale, per ingestione di alimenti o acqua contaminati da sporocisti, più verosimilmente si tratta di vegetali e prodotti freschi provenienti da ambienti contaminati. Gli ospiti intermedi naturali di *S. nesbitti* sono primati non umani cercopitecoidi quali i macachi (*Macaca fascicularis*). L'infezione è caratterizzata da una fase iniziale di sviluppo nell'endotelio vascolare, accompagnata da una sintomatologia aspecifica con febbre, cefalea e mialgia. Il successivo sviluppo di sarcocisti nella muscolatura striata è caratterizzato da quadri di miosite.

Fino agli inizi del terzo millennio il numero di casi sarcocistici umana erano meno di 100 (Fayer, 2004), la maggior parte dei quali rinvenuti come reperto autoptico, senza la documentazione di sintomi clinici *intra vitam*. Circa il 50% di questi casi è stato riscontrato in Malesia (Beaver et al., 1979; Pathmanathan e Kan, 1992; Arness et al., 1999; AbuBakar et al., 2013), mentre gli altri casi in Cina, Usa, Sud America, Europa, India, Sud-Est asiatico (Beaver et al., 1979; Van den Enden et al., 1995).

Nel biennio 2011-2012, Geo Sentinel (programma di sorveglianza della International Society of Travel Medicine and Centers for Disease Control), ha segnalato una serie di epidemie in turisti al rientro da viaggi in Malesia (Centers for Disease Control and Prevention, 2012; Tappe et al., 2013, 2014; Italiano et al., 2014). Il decorso della malattia era tipicamente bifasico, con una prima fase della durata di una settimana caratterizzata da febbre, mialgia e cefalea, seguita da due settimane in cui i pazienti non manifestavano alcun sintomo, al termine dei quali si verifica un episodio febbrile di lunga durata con grave mialgia caratterizzato da eosinofilia e innalzamento dei livelli ematici di creatin-chinasi (Slesak et al., 2014, 2015).

A causa della situazione di endemicità della Malesia, numerose indagini ambientali sono state condotte per la ricerca di oocisti di *S. nesbitti*, ma inizialmente non sono state trovate tracce di *Sarcocystis*, né nell'ambiente né in animali e persone (Husna Maizura et al., 2012). Solo nel 2016 è stata rivelata la presenza di *S. nesbitti* e altre specie di *Sarcocystis* in campioni di acqua di fiume e cisterne d'acqua, come prova del fatto che potrebbe essere l'acqua contaminata da feci di serpente la fonte di infezione che ha innescato le epidemie (Shahari et al., 2016).

Un altro aspetto legato alla sarcocistosi nell'uomo è costituito dall'ipotesi formulata negli anni '80, dell'esistenza di una frazione proteica tossica che si libera in seguito alla rottura della parete delle sarcocisti (Sasha et al., 1985). Le sarcocisti di *S. gigantea* contengono una tossina molto potente detta sarcotossina o sarcocistina, che ha effetti letali se inoculata nel ratto (Al-Tae e Al-Hyali, 2007) e nel coniglio (Brose et al., 1989). Topi e ratti si sono mostrati suscettibili anche alla sarcotossina estratta da *S. fusiformis* (Saleque et al., 1991).

Sarcotossine sono state isolate anche in carni bovine infette da *S. cruzi* (Saito et al., 1995) e in carne di cavallo contenente sarcocisti di *S. fayeri* (Kamata et al., 2014). Queste tossine risultano termolabili, il che sottolinea l'importanza della cottura con temperature di almeno 70°C per rendere le carni ovine sicure per il consumo umano (Al-Hyali et al., 2010).

## 1.3 GIARDIA DUODENALIS

### 1.3.1. Agente eziologico

*Giardia duodenalis* è un protozoo intestinale che può infettare un ampio range di animali domestici e selvatici e anche l'uomo, dando luogo a sindromi gastrointestinali anche gravi, soprattutto in soggetti giovani o immunocompromessi (Adam, 2001).

Il genere *Giardia* (Künstler, 1882) comprende circa 20 specie, tra le quali la più importante è *Giardia duodenalis*, sin. *intestinalis* o *lamblia* (Leeuwenhoek, 1681; Lamb, 1859), che infetta una moltitudine di mammiferi, tra cui l'uomo.

Nella classica classificazione tassonomica, il genere *Giardia* deriva dal Phylum “*Sarcomastigophora*”, Subphylum “*Mastigophora*” (=Flagellata), Classe “*Zoomastigophorea*”, Ordine “*Diplomonadida*” e Famiglia “*Hexamitidae*” (Morrison et al., 2007). Tuttavia il recente inquadramento tassonomico, basato sulle caratteristiche genetiche, biochimiche e strutturali, considera *Giardia* come appartenente al Phylum “*Metamonada*”, Subphylum “*Trichozoa*”, Superclasse “*Eopharyngia*”, Classe “*Trepomonadea*”, Sottoclasse “*Diplozo*”, Ordine “*Giardiida*” e Famiglia “*Giardiidae*” (Cavalier-Smith, 2003).

Sei specie di *Giardia* sono state distinte sulla base delle caratteristiche morfologiche apprezzabili con l'ausilio della microscopia ottica (forma dei trofozoiti e corpo mediano) ed elettronica (bordo ventrolaterale, scanalatura marginale, disco ventrale, flagello) (Adam, 2001). Cinque di queste specie sono state isolate da anfibi (*G. agilis*), uccelli (*G. ardeae*, *G. psittaci*), topi e arvicole (*G. muris*, *G. microti*) (Cacciò et al., 2005; McRoberts et al., 1996; Adam, 2001). La sesta specie include ceppi di *Giardia* isolati da vari mammiferi, raggruppati da Filice (1952) in una singola specie in quanto condividono le caratteristiche morfologiche (Plutzer et al., 2010).

La moltitudine di studi biomolecolari effettuata nel corso degli anni su *G. duodenalis*, ha dato luogo ad una ulteriore suddivisione in gruppi basati sulla diversità genetica delle sequenze che codificano per i geni codificanti glutammato deidrogenasi/gdh, triosofosfato isomerasi/tpi, e  $\beta$ -giardina/bg.

Questi raggruppamenti prendono il nome di Assemblaggi, e vengono identificati usando le lettere dalla A alla G; gli Assemblaggi A e B sono ulteriormente suddivisi in Sub Assemblaggi.

- Assemblaggio A (gruppo I): uomo e altri mammiferi (Homan, 1992; Mayrhofer, 1995; Karanis and Ey, 1998);
- Assemblaggio A (gruppo II): uomo (Homan, 1992; Mayrhofer, 1995; Karanis and Ey, 1998);
- Assemblaggio B (gruppo III): uomo e altri mammiferi (Homan, 1992; Mayrhofer, 1995);
- Assemblaggio B (gruppo IV): uomo (Homan, 1992; Mayrhofer, 1995);

- Assemblaggio C/D: cani (Meloni and Thompson, 1987; Monis et al., 1998);
- Assemblaggio E: specie di interesse zootecnico (Ey et al., 1997);
- Assemblaggio F: gatti (Monis et al., 1999)
- Assemblaggio G: ratti (Monis et al., 1999)

### 1.3.2 Ciclo biologico

Il ciclo vitale di *G. duodenalis* comprende due forme: il trofozoita e la cisti. Il trofozoita è la forma attiva, mobile e dotata di flagelli, che aderisce alla mucosa intestinale (15µm x 9 µm x 3 µm). Le cisti rappresentano invece la fase di resistenza, hanno forma ellittica (7-16µm) e vengono espulse nell'ambiente esterno con le feci.

*G. duodenalis* ha un ciclo diretto a un ospite. L'infezione avviene tramite l'ingestione delle cisti, che si escitano a livello del duodeno dopo l'esposizione agli acidi gastrici ed enzimi pancreatici. Durante questo processo le strutture interne vengono duplicate con la produzione di due trofozoiti quadrinucleati (De Carneri, 2004), che attaccano i villi epiteliali tramite il disco adesivo. In sede intestinale si moltiplicano per fissione binaria dando origine a trofozoiti binucleati e solo allora s'incistano. Le cisti si ritrovano nelle feci da una a due settimane dopo l'infezione. Anche i trofozoiti possono essere rinvenuti nelle feci, solitamente in caso di diarrea acuta, ma raramente sopravvivono per un periodo significativo al di fuori dell'ospite (Adam, 1991).

### 1.3.3 Fonti di contagio e trasmissione

Le cisti di *Giardia* sono trasmesse per via oro-fecale, diretta o indiretta. I potenziali meccanismi di trasmissione comprendono: da persona a persona, da animale ad animale, zoonotico (da animale a uomo, da uomo ad animale). Gli animali e l'uomo si possono inoltre infettare attraverso l'acqua contaminata, sia per ingestione sia per uso ricreazionale (ad esempio nel nuoto), o attraverso cibi contaminati (Plutzer et al., 2010; Karanis et al., 2007; Porter et al., 1990; Shields et al., 2008; Takizawa et al., 2009).

A differenza di altri parassiti, quali ad esempio i nematodi, le cisti di *Giardia* non necessitano di ulteriori periodi di maturazione o attivazione dopo la loro escrezione, ma sono immediatamente in grado di infettare un nuovo ospite (Svärd et al., 2003).

Gli animali giovani sembrano essere i maggiori eliminatori di cisti, ma le femmine in gestazione o in lattazione rappresentano un'importante fonte d'infezione per i lattanti (Olson, 2004), fatto probabilmente imputabile all'azione immunosoppressiva di ormoni quali progesterone, estrogeni e



prolattina (Cordero del Campillo, Vázquez, 1999; Xiao, 1994; Xiao et al., 1994). Sono fonte d'infezione sia gli animali clinicamente malati sia i portatori asintomatici, eliminatori di cisti.

La resistenza delle cisti nell'ambiente esterno dipende da fattori climatici quali temperatura e umidità: è stato dimostrato che resistono circa 77 giorni a 8°C, dai 5 ai 24 giorni a 21°C e circa 4 giorni a 37°C in acqua distillata (Cordero del Campillo, Vázquez, 1999). In uno studio condotto da Olson (1997) è stata valutata per 12 settimane la vitalità delle cisti di *Giardia* in acqua, suolo e deiezioni bovine a diverse temperature (-4°C, 4°C, 25°C). I risultati hanno dimostrato l'inattivazione delle cisti dopo 1 settimana a -4°C in tutte le matrici, e dopo 2 settimane a 25°C. Alla T 4°C le cisti sono rimaste vitali per una sola settimana nelle feci bovine, 7 settimane al suolo e ben 11 settimane in acqua.

Studi condotti in Norvegia mostrano che i cicli di congelamento-scongelo che avvengono sui pascoli negli inverni in Nord Europa devitalizzano le cisti di *Giardia*, il che suggerisce che il parassita non persista nell'ambiente nella stagione invernale (Robertson e Gjerde, 2004). Chiaramente questo criterio non può essere applicato nei Paesi Mediterranei, in cui le temperature invernali scendono raramente sotto gli 0°C (Plutzer et al., 2010).

Le cisti di *Giardia* sono sensibili ai raggi UV, che potrebbero rappresentare un efficace mezzo di disinfezione per le acque (Karanis et al., 1992; Linden, 2002). Disinfettanti quali cloro e derivati si sono dimostrati poco efficaci nei confronti del protozoo (Khalifa et al., 2001) che risulta invece sensibile all'ipoclorito di sodio (Kim et al., 2001; Briancesco et al., 2005).

Animali allevati in prossimità di riserve idriche e raccolte d'acqua possono costituire una fonte di infezione importante, sia per se stessi sia per l'uomo, in considerazione del fatto che è stata spesso segnalata la presenza ceppi appartenenti agli assemblaggi A e B negli animali da reddito come ovi-caprini, bovini, suini ed equini (Plutzer et al., 2010). In alcune epidemie in Spagna e Nord America è stata accertata la contaminazione delle acque ad opera anche di animali selvatici quali topi muschiati, castori, nutrie e lontre (Dunlap e Thies, 2002; Fayer et al., 2006; Méndez-Hermida et al., 2007). È stato inoltre osservato che uccelli acquatici possono contribuire alla contaminazione dell'ambiente (Majewska et al., 2009; Plutzer e Tomor, 2009).

La contaminazione delle acque è un aspetto sempre più importante della trasmissione di *Giardia*, tanto da renderlo insieme a *Criptosporidium* uno dei più frequenti *waterborne pathogens* (Macpherson et al., 2000). Cisti di *Giardia* sono state rinvenute nelle acque non trattate di molti Paesi Europei tra cui l'Italia (Cacciò et al., 2003; Blasi et al., 2008; Vernile et al., 2009), la Spagna (Castro-Hermida et al., 2008; 2009), il Portogallo (Lobo et al., 2009; Almeida et al., 2006, 2010), e

la Francia (Mons et al., 2009; Coupe et al., 2006), talvolta con un'elevata concentrazione di cisti (sopra le 10/L).

In diversi Paesi è stata riportata la presenza di cisti in acque balneabili e piscine per attività ricreativa (Plutzer et al., 2010).

La contaminazione di frutti, vegetali e molluschi bivalvi è un'altra importante fonte di contagio per l'uomo in quanto spesso vengono consumati crudi (Blasi et al., 2008; Pozio., 2008). È stata riportata la contaminazione di ostriche e mitili e altri molluschi bivalvi (Graczyk et al., 2003; Gomez-Couso et al., 2005), così come quella di vegetali pronti al consumo (Cook et al., 2007).

### **1.3.4 Patogenesi e segni clinici**

L'azione patogena di *G. duodenalis* si esplica attraverso l'alterazione delle cellule intestinali con accorciamento dei villi e conseguenti fenomeni di malassorbimento e mal digestione. Ha anche un'azione spoliatrice dei principali elementi nutritivi, con conseguente riduzione dell'incremento di peso, ritardi nella crescita, diminuzione del peso della carcassa (Cordero del Campillo, Vázquez, 1999). È nota inoltre la sua azione foretica, in quanto capace di veicolare all'interno dell'organismo altri patogeni, quali virus, batteri e micoplasmi.

La sintomatologia clinica, quando si manifesta, è caratterizzata da diarrea a decorso acuto o cronico, con feci steatosiche e maleodoranti. I fenomeni diarroici hanno solitamente carattere intermittente, intervallati da brevi periodi di benessere e con emissione di feci normali e ben formate. Alla diarrea possono accompagnarsi altri sintomi come febbre (fino a 40°C), anoressia, vomito, distensione e dolore addominale, disidratazione, pelo opaco (Cordero del Campillo, Vázquez, 1999) e nei bambini ritardo di crescita e fenomeni di malassorbimento (Adam. 1991; Wolfe, 1992).

La patogenicità di *G. duodenalis* può essere messa in relazione con diversi fattori tra cui la risposta immunitaria e lo stato nutrizionale dell'ospite, nonché con la presenza di altri parassiti gastro-intestinali (Thompson, 2000; Sackey et al, 2003). I fattori che influenzano principalmente la gravità del quadro clinico possono essere dipendenti dal parassita (tipo di ceppo, quantità di cisti ingerite), dall'ospite (età e stato immunitario), o dall'ambiente (umidità, temperatura, igiene dei locali, management degli animali, eventuale presenza di altri ospiti che possono contaminare l'ambiente) (Cordero del Campillo, Vázquez, 1999). L'età dell'ospite è un fattore molto importante in quanto è stato dimostrato che soggetti da 1 agli 8 mesi per gli animali e da 1 a 4 anni per i bambini, risultano più recettivi all'infezione, indipendentemente dalla razza e dal sesso (Flagganan, 1992),

Il colostro svolge una funzione protettiva nel lattante almeno nelle prime settimane di vita; anche la vacca in lattazione produce colostro e latte con attività anti-*Giardia*, proteggendo in tal modo i

giovani animali dall'infezione (Olson et al., 2000). L'infezione da *G. duodenalis* stimola una immunità umorale che determina un'infezione autolimitante in molte specie animali (Olson et al., 2000). Tuttavia, possono trascorrere anche alcuni mesi prima che l'ospite produca anticorpi protettivi capaci di eliminare il parassita. E' stato dimostrato che le bovine non sviluppano un'efficace risposta umorale contro *G. duodenalis* persino dopo 100 giorni dall'infezione (O'Handley et al., 2003).

La maggior parte dei casi presentano tuttavia un decorso asintomatico, ma gli animali pur non manifestando segni clinici eliminano le cisti nell'ambiente, fungendo da reservoir e quindi da eliminatori silenti di cisti. Anche nei casi asintomatici, dopo circa un mese, il processo si cronicizza e molti soggetti non presentano più i sintomi ma fungono comunque da portatori asintomatici. Non sembra esistere l'eventualità della guarigione spontanea. La concomitante presenza di altri processi patologici di origine batterica, virale o parassitaria può aggravare e mascherare il processo (Cordero del Campillo, Vázquez, 1999).

### **1.3.5 Giardiosi nell'uomo**

La giardiosi umana è la prima causa di disturbi gastrointestinali in tutto il mondo, con infezioni più frequenti tra i bambini sotto i 5 anni di età e in misura minore in soggetti immunodepressi (Adam, 2001). La patologia è stata messa in correlazione con ritardi della crescita e cognitivi in bambini che vivono in ambienti poveri e svantaggiati, contribuendo a compromettere lo sviluppo socioeconomico delle regioni endemiche (Berkman et al., 2002). *G. duodenalis* è anche il protozoo di più frequente riscontro nei paesi sviluppati, per i quali sono riportate prevalenze che variano dal 2 al 7% a seconda del tipo di popolazione oggetto degli studi (Fletcher et al., 2012).

Nel 1979 viene inserita dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), tra le cause di malattie a carattere zoonosico (WHO, 1979).

L'uomo acquisisce la giardiosi attraverso la via oro-fecale, generalmente in seguito a contatto diretto con individui infetti, sebbene siano sempre più spesso documentate epidemie dovute all'assunzione di acqua (Baldursson et al., 2012) e cibo (Robertson, 2013) contaminati. Anche se in misura minore, gli animali da compagnia possono, per via diretta o indiretta, fungere da reservoir per l'infezione umana in determinate condizioni (Feng e Xiao, 2011). L'infezione può essere contratta con l'ingestione di un piccolissimo numero di cisti, anche inferiore a 10 (Rendtorff 1954). I sintomi sono diarrea, flatulenza, feci grasse, dolori addominali, nausea e disidratazione, e compaiono circa 1-2 settimane dopo l'ingestione di cisti.

Più della metà degli individui infetti rimangono asintomatici, e una parte di questi diventano anche eliminatori (Nash et al., 1987). Soprattutto in soggetti immunodepressi l'infezione cronicizza e i sintomi si protraggono inducendo gravi disidratazione, malassorbimento, dimagrimento e talvolta il decesso (WHO,; Doufour et al. 2012).

La stragrande maggioranza delle infezioni da *G. duodenalis* nell'uomo, sono sostenute dagli assemblaggi A (~37%) e B (~58%), e questa proporzione rimane costante indipendentemente dallo stato socioeconomico delle popolazioni studiate e dall'area geografica considerata (Ryan e Cacciò, 2013). Il restante 5% circa di infezioni è imputato agli assemblaggi C, D, E e F, sporadicamente identificati in isolati umani, che tuttavia possiedono un potenziale zoonotico (Feng e Xiao, 2011; Ryan e Cacciò, 2013).

Come per *Cryptosporidium*, le epidemie causate da *G. duodenalis* negli Stati Uniti hanno un picco stagionale che coincide con l'estate, e le attività acquatiche, riflettendo un aumento nella frequentazione di fiumi, laghi, piscine e parchi acquatici. Allo stesso modo in Thailandia in un'epidemia di giardiosi, la causa è stata identificata nel nuotare nei canali urbani nella stagione delle piogge, in particolare in una area particolarmente inquinata, a valle di un mercato all'ingrosso (Diallo et al. 2008).

In Sardegna è stata condotta un'indagine nella città di Sassari nel triennio 1990-1993, su campioni fecali provenienti da adulti, bambini e soggetti immunodepressi, in cui è stata riscontrata una prevalenza per *Giardia* spp. del 58,2% (Sanna, 1994).

La prevalenza dell'infezione da *Giardia* nella popolazione Italiana è stata stimata in numerosi studi, che mostrano una prevalenza media vicina al 3%, con un range che va dallo 0,9% al 7,9% (Crotti et al., 2005). In studi effettuati su bambini, i tassi di prevalenza variano dallo 0 al 10,1 %, con una prevalenza media del 2,7 % (321 / 11776), mentre negli adulti variano dal 1,6% al 5,1%, con una media simile a quella osservata nei bambini (1,7%, 157 / 5782). La caratterizzazione biomolecolare degli isolati umani ha definito che solo gli Assemblaggi A e B di *G. duodenalis* sono associati all'infezione umana in Italia (Cacciò et al., 2002; Lalle et al., 2005).

## 2. PARTE SPERIMENTALE

### 2.1. FASE 1 - VALUTAZIONE DELLA PRESENZA DELLA CRIPTOSPORIDIOSI NEGLI OVINI DELLA SARDEGNA E IDENTIFICAZIONE DEI GENOTIPI CIRCOLANTI

#### 2.1.1 Background

La criptosporidiosi è stata descritta per la prima volta nell'ovino in Australia, in particolare in agnelli di età compresa tra 1 e 3 settimane che presentavano diarrea (Barker and Carbonell, 1974). Tuttavia, il ruolo di *Cryptosporidium* spp. come agente primario di diarrea negli ovini è stato confermato solo all'inizio degli anni '80, a seguito di infezioni sperimentali in assenza di altri enteropatogeni (Angus et al., 1982; Snodgrass et al., 1984). Da allora, la sua importanza come causa di diarrea neonatale negli agnelli è stata progressivamente riconosciuta; attualmente si ritengono caratteristiche l'alta morbilità e la bassa mortalità, sebbene a seconda delle condizioni ambientali e della presenza di altri patogeni intestinali vi possano essere anche casi con decorso fatale (Angus, 1990; Matos-Fernández et al., 1994; Muñoz-Fernández et al., 1996).

Secondo Robertson (2009) la prevalenza di *Cryptosporidium* spp. negli ovini, in tutto il mondo, si avvicina al 30%, sebbene nei diversi studi effettuati possa variare tra il 5 e il 70%; queste variazioni dipendono da diversi fattori, tra cui la gestione degli animali, la tecnica diagnostica utilizzata, il numero di campioni raccolti per animale, l'età degli animali e la presenza di sintomi clinici. Gli studi più recenti riportano prevalenze per lo più inferiori al 15% in animali sani (Majewska et al., 2000; Sturdee et al., 2003; Pritchard et al., 2007; Geurden et al., 2008; Wang et al., 2010; Ye et al., 2013; Koinari et al., 2014; Tzanidakis et al., 2014), sebbene siano state riportate anche prevalenze dal 15% al 40% (Ryan et al., 2005; Pritchard et al., 2008; Paoletti et al., 2009; Sari et al., 2009; Yang et al., 2009).

Negli ovini, sono stati pubblicati molti studi sulle infezioni da *Cryptosporidium* spp., nei quali sono state identificate un gran numero di specie tra cui: *C. andersoni*, *C. bovis*, *C. fayeri*, *C. hominis*, *C. meleagridis*, *C. parvum*, *C. ryanae*, *C. scrofarum*, *C. suis*, *C. ubiquitum* e *C. xiaoi*. Le specie maggiormente riscontrate sono le specie zoonotiche *C. parvum*, *C. ubiquitum* e *C. xiaoi*.

*C. parvum* è una specie cosmopolita con ridotta specificità d'ospite, in grado di infettare un gran numero di mammiferi domestici e selvatici (Xiao, 2010; Ryan et al., 2014; Abeywardena et al., 2015). Diversi studi hanno indicato *C. parvum* come specie dominante nelle pecore, specialmente nei soggetti più giovani (Majewska et al., 2000; McLauchlin et al., 2000; Pritchard et al., 2007; 2008; Paoletti et al., 2009; Yang et al., 2009; Smith et al., 2010; Koinari et al., 2014). La comunità scientifica lo considera oggi il principale responsabile delle epidemie di diarrea negli allevamenti

ovini (Chalmers et al., 2002; Mueller-Doblies et al., 2008; Quílez et al., 2008b; Diaz et al., 2010a, 2015; Cacciò et al., 2013; Imre et al., 2013).

*C. ubiquitum*, è una specie cosmopolita considerata “generalista”, in quanto identificata in campioni provenienti da una grande varietà di mammiferi domestici e selvatici, e nell’uomo (Šlapeta, 2013). In diversi studi condotti in greggi di pecore è stata identificata come la specie predominante (Ryan et al., 2005b; Santín et al., 2007; Cama et al., 2008; Wang et al., 2010; Fiuza et al., 2011; Shen et al., 2011; Sweeny et al., 2012). Per quanto riguarda la sua patogenicità, *C. ubiquitum* è stato isolato in campioni fecali di soggetti con diarrea appartenenti a diverse specie animali (Díaz et al., 2010a, 2015; Šlapeta, 2013); tuttavia, sperimentalmente, in nessuna delle specie animali studiate sono stati evidenziati segni clinici (Fayer et al., 2010). Inoltre, sebbene questa specie abbia potenziale zoonotico e sia considerata una specie emergente, i casi sin qui riportati nell’uomo sono scarsi, per cui la sua importanza per la salute pubblica è attualmente considerata ridotta (Santín et al., 2007; Chalmers et al., 2009a; Šlapeta, 2013).

*C. xiaoi* è una specie recentemente descritta da Fayer e Santín (2009), che presenta una sequenza del gene SSUrRNA molto simile a quella di *C. bovis*, motivo per cui prima che venissero eseguiti gli studi morfologici e biologici, era noto come *Cryptosporidium bovis*-like. Questa grande somiglianza ha portato diversi autori a commettere errori di identificazione; infatti, è stato confermato che, in diversi studi, gli isolati di *C. bovis* negli ovini erano in realtà *C. xiaoi* (Elwin and Chalmers, 2008, Mueller-Doblies et al., 2008, Yang et al., 2009). Infatti, in alcune pubblicazioni in cui solo l'analisi genotipica viene eseguita utilizzando un solo gene (18S), gli isolati sono identificati come *C. bovis/xiaoi* (Mirhashemi et al., 2016). La sua gamma di ospiti non è ancora conosciuta esattamente, ma si presume che sia molto limitata e comprenda principalmente ruminanti domestici e selvatici, perché finora è stato riscontrato solo in ovini e caprini in tutto il mondo (Šlapeta, 2013; et al., 2015), così come negli yak in Cina (Karanis et al., 2007; Ma et al., 2014) e nei buoi muschiati in Norvegia (Davidson et al., 2014). È stato identificato anche in un pesce (*Sillago vittata*) appartenente all'Ordine dei Perciformes, probabilmente a causa della contaminazione dell'ambiente marino con deiezioni di origine zootecnica (Reid et al., 2010).

Sebbene le tre specie più frequenti di *Cryptosporidium* nelle pecore abbiano una distribuzione cosmopolita, gli studi molecolari condotti su questi ruminanti suggeriscono, fino ad ora, l'esistenza di importanti differenze nella loro distribuzione geografica (Šlapeta, 2013; Taylan-Ozkan et al., 2016; Kaupke et al., 2017): *C. xiaoi* è la specie predominante in Africa e Oceania e *C. ubiquitum* è la più abbondante in America e Asia (Ye et al., 2013). In Europa, è *C. parvum* la specie più frequentemente identificata, sebbene questi dati siano riportati perlopiù in indagini effettuate su

animali con diarrea, dove predominano le infezioni da questa specie (Chalmers et al., 2002; Mueller-Doblies et al., 2008).

Diverse indagini hanno determinato che l'età degli animali è un fattore che influenza in modo significativo la prevalenza di *Cryptosporidium* spp. (De Graaf et al., 1999a), che risulta più elevata negli agnelli in lattazione (Xiao et al., 1993, Causapé et al., 2002; Majewska et al., 2000, Ryan et al., 2005, Santín et al., 2007), più suscettibili all'infezione e che hanno quindi una maggiore probabilità di sviluppare la malattia clinica (De Graaf et al., 1999a, Mueller Doblies et al., 2008, Díaz et al., 2010a, 2015). Gli animali più anziani hanno generalmente tassi di infezione più bassi, probabilmente a causa dello sviluppo di una risposta immunitaria protettiva dopo l'esposizione a ripetute reinfezioni con il parassita (Wang et al., 2009). *C. parvum* è la specie principale identificata nei focolai di diarrea neonatale (Mueller-Doblies et al., 2008; Quílez et al., 2008b; Robertson, 2009; Diaz et al., 2010a, 2015; Cacciò et al., 2013; Imre et al., 2013) come negli agnelli sani (Pritchard et al., 2007; Mueller-Doblies et al., 2008; Paoletti et al., 2009; Yang et al., 2009). Le infezioni da criptosporidi negli animali adulti sono solitamente asintomatiche (Santín et al., 2007), e sostenute da specie meno patogene e una elevata specie-specificità, come *C. ubiquitum* e *C. xiaoi* (Wang et al., 2010).

I dati riportati sulla prevalenza dell'infezione nell'ovino in Italia sono limitati. La sola indagine che ci risulta pubblicata riporta una prevalenza del 17,45%, rilevata con la metodica ELISA (Paoletti et al., 2009), con identificazione della specie *C. parvum*. In uno studio più recente è stata effettuata la sub tipizzazione di *C. parvum* in un focolaio di criptosporidiosi in Italia Centrale, che ha rivelato il sottotipo IIa (Cacciò et al., 2013).

L'obiettivo di questa indagine è pertanto quello di valutare la diffusione della criptosporidiosi negli ovini della Sardegna, e di stabilire quali siano le specie ed i genotipi circolanti.

## **2.1.2 MATERIALI E METODI**

### **2.1.2.1 Campionamento**

Per valutare la diffusione di *Cryptosporidium* spp. negli ovini di razza sarda sono stati esaminati in totale 915 animali, provenienti da 61 allevamenti siti in tutto il territorio della Sardegna. Il campionamento ha avuto luogo durante la stagione dei parti 2015/2016 (novembre 2015/febbraio 2016) su tre differenti categorie di ovini:

- agnelli in lattazione di età inferiore a 30 giorni;
- pecore adulte nell'ultimo mese di gravidanza;
- pecore adulte che avevano partorito da massimo 30 giorni.

Per ogni categoria di ovini sono stati prelevati 305 campioni, nello specifico 15 campioni per allevamento, in quanto in ogni azienda venivano prelevati 5 campioni per ogni categoria di soggetti. Al momento del campionamento il materiale fecale veniva classificato in base alla sua consistenza in tre differenti classi:

- 1) feci normali (feci secche disidratate scarsamente cedevoli al tatto negli agnelli o pellet fecali evidenti nelle pecore);
- 2) feci pastose (feci facilmente cedevoli al tatto, pellet non conformati nelle pecore);
- 3) feci liquide/diarroiche.

I campioni coprologici venivano ottenuti su ogni soggetto tramite prelievo rettale. I campioni venivano quindi riposti in un contenitore refrigerato a 4° C, debitamente contrassegnati e recapitati entro 24h presso il laboratorio di Parassitologia dell’Ospedale Didattico Veterinario (ODV) del Dipartimento di Medicina Veterinaria di Sassari per essere sottoposti ad analisi.

#### **2.1.2.2 Analisi microscopica**

Nel laboratorio di coprologia i campioni venivano analizzati per il riscontro diretto di oocisti di *Cryptosporidium* spp..

Da ogni campione fecale veniva allestito uno striscio di feci secondo la metodica di Ziehl-Neelsen modificata da Angus (1987).

Il campione fecale veniva strisciato su un vetrino portaoggetto (precedentemente sgrassato) e fatto asciugare all’aria. Successivamente veniva fissato con metanolo e fatto asciugare all’aria per altri due minuti. Seguiva colorazione con Fucsina di Ziehl per almeno 5 minuti, quindi il vetrino veniva sciacquato in acqua corrente e decolorato in etanolo acido per pochi secondi allo scopo di eliminare l’eccesso di colorante. Dopo un ulteriore risciacquo in acqua corrente il vetrino veniva contrastato in Verde malachite per 30 secondi e nuovamente sciacquato in acqua corrente e fatto asciugare all’aria. L’ultima fase consisteva nel montare il vetrino con una resina sintetica Permout e coprire con vetrino copri oggetto.

A questo punto il vetrino veniva esaminato al microscopio ottico, fino all’ingrandimento 40X. In caso di positività le oocisti apparivano fucsia su fondo azzurro (Figura 1).

La media del numero delle oocisti di *Cryptosporidium* spp. veniva ottenuta su ogni campione positivo tramite una conta delle stesse in 10 campi per ogni vetrino esaminato al microscopio ottico a 40X (Figura 2).



### 2.1.2.3 Indagine biomolecolare

Per l'indagine biomolecolare 35 campioni di feci risultati positivi all'esame microscopico a *Cryptosporidium* spp. venivano sottoposti all'estrazione del DNA utilizzando il kit commerciale QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, Germany).

Ogni campione di feci veniva sottoposto a 3 cicli di congelamento in azoto liquido (-196°C per 1 minuto) e scongelamento (100°C per 5 minuti) con lo scopo di frammentare la spessa parete oocistica di *Cryptosporidium* spp. ed incrementare il rendimento del processo di estrazione del DNA. Il DNA estratto veniva stoccato a -20°C fino alla successiva fase di PCR.

Per identificare i genotipi di *Cryptosporidium* spp. veniva eseguita una Nested PCR che amplifica un frammento del gene che codifica per SSU rRNA, applicando il protocollo descritto da Jiang et al. (2005). Ciascuna reazione di PCR veniva condotta in un volume finale di 25µl contenente PCR buffer (1X), MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM), dNTPs (0,2 mM di ognuno), primer FOR (0,2 µM), primer REV (0,2 µM), 1 U di Taq polimerasi (Invitrogen), DNA, H<sub>2</sub>O milliq. In ciascuna reazione di PCR veniva incluso un controllo negativo per verificare la correttezza del procedimento.

Nella prima reazione è stato amplificato un frammento di 1.325 paia di basi (bp) utilizzando una coppia di primers esterni, 18S 1F (5'-TTCTAGAGCTAATACATGCG-3') e 18S 1R (5'-CCCATTTTCCTTCGAAACAGGA-3'). Nella seconda reazione è stato utilizzato 1µl del prodotto di PCR della prima reazione e una coppia di primers interni, 18S 2F (5'-GGAAGGGTTGTATTTATTAGA TAAAG-3') e 18S 1R (5'-CTCATAAGGTGCTGAAGGAGTA-3'), che amplificano un frammento interno di 840 bp.

Le amplificazioni venivano effettuate utilizzando il termociclatore GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA).

Per quanto riguarda i parametri di reazione venivano utilizzate per entrambi gli step le seguenti condizioni: denaturazione iniziale a 94°C per 3 minuti, seguita da 35 cicli di 45 secondi a 94°C (denaturazione), 45 secondi a 55°C (annealing) e 60 secondi a 72°C (estensione) e un'estensione finale a 72°C per 7 minuti.

Gli amplificati ottenuti dalla Nested PCR venivano sottoposti a elettroforesi in gel di agarosio all'1% in tampone TAE 1X (Tris-Acetato 40mM, Na<sub>2</sub>EDTA 0,1 Mm, pH 8) e Sybr Safe DNA gel stain (Invitrogen). La visualizzazione dei risultati e l'acquisizione dell'immagine veniva effettuata mediante lo strumento UVITEC (Cambridge). La stima della lunghezza del frammento veniva effettuata mediante l'utilizzo dello standard di pesi molecolari Thermo Scientific GeneRuler (100 bp DNA ladder).

Per determinare la specie e/o il genotipo veniva eseguita un'analisi del polimorfismo mediante RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Per realizzare questa analisi, i prodotti della seconda reazione di PCR venivano sottoposti a digestione con le endonucleasi di restrizione SspI, VspI e MboII a 37°C per almeno 2 ore. I frammenti di restrizione ottenuti venivano sottoposti ad elettroforesi in gel di agarosio al 2% in tampone TAE 1X e Sybr Safe DNA gel stain (Invitrogen), a 110 V per 70 minuti. L'acquisizione dell'immagine veniva effettuata mediante lo strumento UVITEC (Cambridge). Le specie e/o i genotipi venivano stabiliti confrontando i pattern di digestione ottenuti con quelli descritti in letteratura (Feng et al., 2007; Xiao e Ryan, 2008).

Gli isolati identificati come *C. parvum* e *C. ubiquitum* all'RFLP, venivano subtipizzati mediante il sequenziamento di un frammento (800-850bp) del gene che codifica per la glicoproteina 60 kDa (GP60), ottenuto con una Nested PCR (Alves et al. 2003; Li et al. 2014).

La Nested PCR per subtipizzare *C. parvum* veniva condotta per ciascuna reazione in un volume di 25µl contenente PCR Buffer 1x, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, 200 µM di ciascun dNTP, 5U di Taq polimerasi (Invitrogen), 0,2 µM di ciascun primer: GP601F (5'- ATAGTCTCCGCTGTATTC -3') e GP601R (5'- GGAAGGAACGATGTATCT -3') per il primo step e GP602F (5'- TCCGCTGTATTCTCAGCC-3') e GP602R (5'- GCAGAGGAA CCAGCATC-3') per il secondo step. Le condizioni termiche comprendevano una denaturazione iniziale a 95°C per 3 minuti, 40 cicli di 45 secondi a 95°C, 45 secondi a 52°C e un minuto a 72°C, estensione finale a 72°C per 10 minuti.

La Nested PCR effettuata per amplificare un frammento del gene GP60 di *C. ubiquitum* utilizzava per la prima reazione i primers Ubi-18S-F1 (5'-TTTACCCACACATCTGTAGCGTCCG-3') e Ubi-18S-R1 (5'-ACGGACGGAATGATGTATCTGA-3'), e per la seconda reazione i primers Ubi-18S-F2 (5'-ATAGGTGATAATTAGTCAGTCTTTAAT-3') e Ubi-18S-R2 (5'-TCCAAAAGCGGCTGAGTCAGCATC-3'). Amplifications were carried out in a GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem, USA). Le condizioni termiche comprendevano una denaturazione iniziale a 94°C per 5 minuti, 35 cicli di 45 secondi a 94°C, 45 secondi a 58°C e un minuto a 72°C, estensione finale a 72°C per 7 minuti.

Il sottotipo veniva attribuito utilizzando la nomenclatura descritta da Sulaiman et al. (2005).

I prodotti dell'amplificazione venivano sottoposti ad una elettroforesi in gel d'agarosio all'1% in tampone TAE 1X e Sybr Safe DNA gel stain (Invitrogen) e in seguito visualizzati mediante lo strumento UVITEC (Cambridge). Per stabilire i subtipi presenti, i campioni sono stati inviati presso un laboratorio esterno per il sequenziamento mediante sequenziatore automatico (Eurofins

Medigenomix GmbH) e le sequenze ottenute sono state confrontate con quelle depositate in GenBank.

Tutti i dati ottenuti sono stati implementati su un foglio elettronico della Microsoft EXCEL vers. 2007 ed elaborati tramite i software statistici EpiInfo Ver.3.5.3 - 2012 e MINITAB Release 12.1.

In particolare sono stati attuati i confronti tra le prevalenze tramite il test del  $\chi^2$ , mentre per il confronto delle medie delle oocisti di *Cryptosporidium* spp. nelle varie categorie tramite il test ANOVA ad una via. Sono state inoltre valutate le probabilità di rischio attraverso il calcolo delle Odds Ratio (OR).

Differenze statisticamente significative sono state ritenute quelle pari a  $P < 0,05$ .

### 2.1.3 RISULTATI

Oocisti di *Cryptosporidium* spp. (Figura 1) sono state riscontrate nel 34,4% (21/61) degli allevamenti ovini monitorati e nel 10,1% dei campioni controllati (92/915).

La stratificazione dei tassi di prevalenza per *Cryptosporidium* spp. nelle tre categorie di ovini prese in considerazione ha evidenziato la seguente situazione:

- a) agnelli 16,4% (50/305);
- b) pecore in gravidanza 7,2% (22/305);
- c) pecore nel periodo post parto 6,6% (20/305).

Il confronto tra questi tassi di prevalenza al test del  $\chi^2$  è risultato il seguente:

agnelli/pecore nel periodo post parto :  $\chi^2 = 14,52$ ;  $P = 0,00013$ ;

agnelli/pecore in gravidanza:  $\chi^2 = 12,35$ ;  $P = 0,00044$ ;

pecore nel periodo post parto /pecore in gravidanza:  $\chi^2 = 0,10$ ;  $P = 0,749$ .

L'elaborazione dei dati relativi sempre a *Cryptosporidium* spp. stratificati per livello di consistenza delle feci ha evidenziato la situazione riportata nella Tabella 1.

Il confronto dei tassi di prevalenza elaborati per le tre tipologie di consistenza fecale rilevata (N= normale; P= pastosa; D= liquida/diarroica) per ogni categoria di ovini esaminata ha evidenziato al test del  $\chi^2$  quadro i risultati sotto riportati:

- agnelli -  $\chi^2$  con due gradi di libertà= 23,88,  $P = 0,00001$ ;
- pecore nel periodo post parto -  $\chi^2 = 2,10$ ;  $P = 0,147$ ;
- pecore in gravidanza -  $\chi^2 = 2,01$ ;  $P = 0,156$ .

Il rischio di riscontrare un campione positivo (OR) a *Cryptosporidium* spp. nelle feci pastose e diarroiche rispetto a quelle normali (OR= 1) degli agnelli è risultato rispettivamente pari a 2,56 e

6,26, mentre nelle pecore nel periodo post parto tale valore tra feci normali e pastose è risultato pari a 0,50 ( $0,18 < OR < 1,40$ ) e nelle pecore in gravidanza di 0,54 ( $0,21 < OR < 1,38$ ).

Il confronto tra le medie delle oocisti eliminate nei soggetti positivi (Intensità Media – IM), ha evidenziato valori più elevati negli agnelli ( $18,24 \pm 40,53$ ) rispetto alle pecore nel periodo post parto ( $14,04 \pm 23,18$ ) e alle pecore in gravidanza ( $5,51 \pm 7,97$ ); tuttavia tale differenze nelle tre categorie di ovini esaminate non risultano differire in modo significativo al test dell'ANOVA ( $F=1,22$ ;  $P= 0,301$ ).

Il confronto tra le medie di oocisti di *Cryptosporidium* spp. delle 3 categorie di ovini esaminate stratificate per consistenza del campione fecale, ha evidenziato valori più elevati per le feci diarroiche ( $25,23 \pm 51,02$ ) rispetto a quelli delle feci normali ( $12,74 \pm 25,22$ ) e delle feci pastose ( $8,10 \pm 13,25$ ), anche se tali differenze non sono risultate statisticamente significative ( $F= 2,35$ ;  $P= 0,101$ ).

Inoltre, l'elaborazione di questo parametro (media oocisti) per ogni categoria di ovini stratificato per consistenza fecale ha evidenziato la situazione riportata nella Tabella 2.

L'analisi del pattern delle bande, ottenuto dopo la digestione (RFLP) dei campioni risultati positivi alla PCR per 18S con le endonucleasi SspI, VspI e MboII, ha permesso di identificare 2 specie di *Cryptosporidium*: 11 campioni sono stati identificati come *C. parvum* e 4 come *C. ubiquitum*.

Gli altri campioni isolati sono risultati positivi alla Nested PCR 18s ma con bande molto deboli che non hanno consentito la realizzazione di un'analisi RFLP.

Per quanto riguarda la subtipizzazione di *C. parvum* l'analisi delle sequenze ottenute della GP60 ha permesso di individuare un sottotipo appartenente alle famiglia allelica IIa A15G2R1 e IId A20G1.

La sub tipizzazione dei campioni di *C. ubiquitum* ha permesso di individuare il sottotipo XIIa. Il dettaglio delle specie e della tipizzazione molecolare è riportato nella Tabella 3.

#### **2.1.4 DISCUSSIONE**

I risultati del presente studio mostrano un'elevata presenza della criptosporidiosi negli allevamenti ovini della Sardegna (34,4%), in cui il protozoo è stato repertato in animali di tutte le età.

I tassi di prevalenza riscontrati negli agnelli (16,4%) risultano in linea con quelli rilevati in altri Paesi europei in cui si riportano tassi variabili dal 13,1% in Belgio (Geurden et al., 2008) al 37,3% in Grecia (Tzanidakis et al., 2014). Anche in questo caso è evidente che situazioni ambientali, di management ed eventualmente fattori genetici possano influenzare tale aspetto.

Nell'ambito della nostra ricerca appare inoltre evidente la maggior recettività alle infezioni da parte degli agnelli, categoria di soggetti evidentemente più "scoperta" sotto l'aspetto immunitario, in analogia a quanto già rilevato anche da Castro-Hermida et al. (2011) in Spagna.

Per quanto concerne invece i tassi di prevalenza nei confronti della criptosporidiosi in pecore che avevano partorito o in pecore in gravidanza non si rilevano differenze statisticamente significative. La prevalenza riscontrata (7%), sebbene non sia molto alta, può rappresentare un importante fattore di rischio in quanto gli animali adulti potrebbero costituire dei *reservoir* dell'infezione quelli più giovani, generalmente più sensibili.

Anche per quanto riguarda le medie di oocisti riscontrate nelle diverse categorie monitorate, gli agnelli presentavano delle medie superiori ( $18,24 \pm 40,33$ ) rispetto alle pecore nel periodo post parto ( $14,04 \pm 23,18$ ) e delle pecore in gravidanza ( $5,51 \pm 7,97$ ), anche se tali valori non differivano significativamente tra loro. Le medie delle pecore nel periodo post parto sono risultate superiori a quelle delle pecore in gravidanza; il considerevole numero di oocisti che potenzialmente possono eliminare questi animali, potrebbe determinare un inquinamento ambientale importante per la trasmissione dell'infezione agli agnelli.

I tassi di prevalenza riscontrati nei campioni fecali di differente consistenza hanno evidenziato un *trend* in aumento dalle feci normali a quelle pastose e diarroiche. Tuttavia tali differenze risultano statisticamente significative esclusivamente negli agnelli, dove tali valori tendono a duplicarsi passando da uno stadio di consistenza all'altro (7,1% feci normali; 16,4% feci pastose; 32,5% feci diarroiche); anche i valori di OR riscontrati ovviamente confermano questo *trend*, in quanto posto come 1 il valore di riferimento delle feci normali i valori di OR risultano pari a 2,56 per le feci pastose e a 6,26 per le feci diarroiche. Tutto questo evidenzia come, nella diagnosi degli enteropatogeni negli agnelli, anche la ricerca delle oocisti di *Cryptosporidium* spp. debba non essere sottovalutata.

Diversi anni fa Mariano e Nardi (2014) sottolineavano, per quanto riguarda la criptosporidiosi in Italia, la mancanza di dati aggiornati sulla prevalenza negli ovini e sui danni economici dovuti alla diarrea, alla mortalità e alla diminuzione degli incrementi ponderali. In effetti ancora oggi non si dispone di dati sufficienti, gli studi scientifici pubblicati negli ultimi anni riguardano perlopiù la segnalazione di focolai d'infezione e la caratterizzazione biomolecolare delle varie specie/genotipi riscontrati (Drumo et al., 2012; Cacciò et al., 2015).

La presente indagine rappresenta pertanto la prima, in Italia, che abbia preso in considerazione la diffusione dell'infezione in varie categorie di animali, che abbia quantificato l'intensità di

eliminazione di oocisti e che abbia stratificato questi risultati in base alla consistenza fecale dei campioni esaminati. Tale indagine assume particolare importanza in Sardegna in quanto la criptosporidiosi è stata in passato segnalata in episodi molto gravi caratterizzati da un'elevata mortalità (Leoni, 1985). L'episodio riportato interessò 125 agnelli di un gruppo di 500 soggetti di 2-7 giorni di età, nei quali la malattia si manifestò con anoressia, seguita da una diarrea incoercibile, caratterizzata da feci di colore giallastro; grave disidratazione, un modico rialzo termico e un rapido deperimento corporeo. In assenza di diagnosi venne applicato un protocollo terapeutico a base di antibiotici e sulfamidici che tuttavia determinò solo una temporanea remissione dei sintomi (Leoni, 1985).

La genotipizzazione ha permesso di individuare le specie *C. parvum* e *C. ubiquitum*. Numerosi studi in tutto il mondo hanno riportato *C. xiaoi* e *C. ubiquitum* come le specie dominanti negli ovini (Yang et al., 2009; Robertson et al., 2010; Wang et al., 2010; Fiuza et al., 2011). Altri autori, invece, ritengono che *C. parvum* (Ryan et al., 2005; Mueller-Doblies et al., 2008; Cacciò et al., 2013; Imre et al., 2013) e *C. hominis* siano più comuni rispetto a *C. ubiquitum* (Connelly et al., 2013).

L'identificazione in questo studio di *C. parvum* è in accordo con quanto riportato sinora sulla criptosporidiosi clinica negli ovini che risulta essere causata principalmente da questa specie, che determina negli agnelli una diarrea liquida giallastra e maleodorante, da lieve a severa, con perdita di peso, depressione e morte che di solito coinvolgono animali fino ad un mese di età (Smith et al., 2005). Il rilevamento di *C. ubiquitum*, un comune patogeno responsabile di infezioni umane (Xiao, 2010), è coerente con quanto riportato in agnelli in Australia (Yang et al., 2014).

La subtipizzazione di *C. parvum* ha permesso di individuare il sottotipo IIa, rilevato in ovini e bovini e in alcuni casi associato a infezioni umane (Quílez et al., 2008; Díaz et al., 2010; Smith et al., 2010), ma anche il sottotipo IIc, già riscontrato in precedenti indagini in Europa (Quílez et al., 2008; Imre et al., 2013).

La sub tipizzazione di *C. ubiquitum* ha permesso di identificare nei nostri isolati il sottotipo XIIa, già riconosciuto come il sottotipo predominante nei piccoli ruminanti a livello mondiale (Li et al., 2014), e identificato nelle infezioni umane (Li et al., 2014).

Questo dato assume particolare importanza per la salute umana, soprattutto per quanto riguarda le persone che vivono a contatto con gli ovini, in quanto il contatto diretto con gli ovini è segnalato come una delle più comuni forme di trasmissione zoonotica, insieme al consumo di acqua non trattata o contaminata da oocisti disseminate dagli ovini. (Li et al., 2014; WHO/FAO, 2014).

## 2.1.5 TABELLE E FIGURE

**Tabella 1** – Positività per *Cryptosporidium* spp. nelle tre categorie di ovini stratificate per gli allevamenti e per livello di consistenza delle feci (N=normale, P=pastosa, D=diarrea).

	Agnelli			P/nel periodo post parto			P/in gravidanza		
	N	P	D	N	P	D	N	P	D
<b>Consistenza fecale</b>									
<b>n. allevamenti</b>	5	10	10	3	4	0	6	5	0
<b>n. soggetti esaminati</b>	140	85	80	154	150	1	181	122	2
<b>n. soggetti positivi</b>	10	14	26	7	13	0	10	12	0
<b>Prevalenza (%)</b>	7,1	16,4	32,5	4,5	8,6	/	5,5	9,8	/

**Tabella 2** - Media oocisti nelle tre categorie di ovini stratificate per consistenza fecale (N=normale, P=pastosa, D=diarrea).

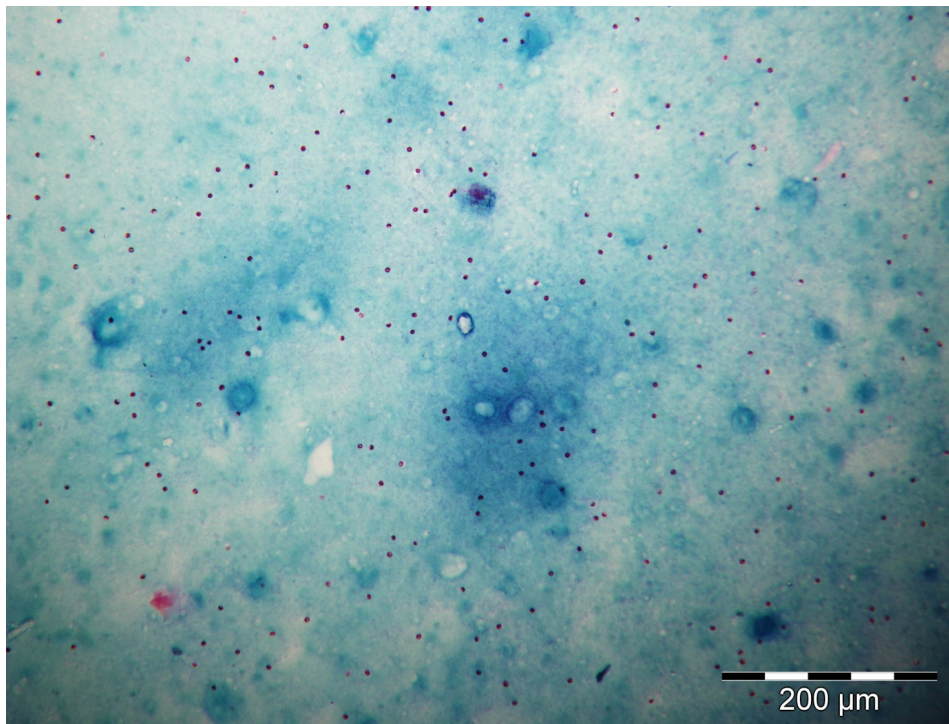
	Agnelli			P/ nel periodo post parto			P/ in gravidanza		
	N	P	D	N	P	D	N	P	D
<b>Media oocisti</b>	13,00	9,29	25,23	22,29	9,26	/	5,80	5,08	/
<b>Dev.Standard</b>	29,08	16,43	51,03	33,51	15,11	/	10,88	4,90	/
<b>test ANOVA</b>	F=0,82; P=0,446			F=1,39; P=0,254			F=0,04; P=839		

**Tabella 3** - Risultati dell'indagine biomolecolare

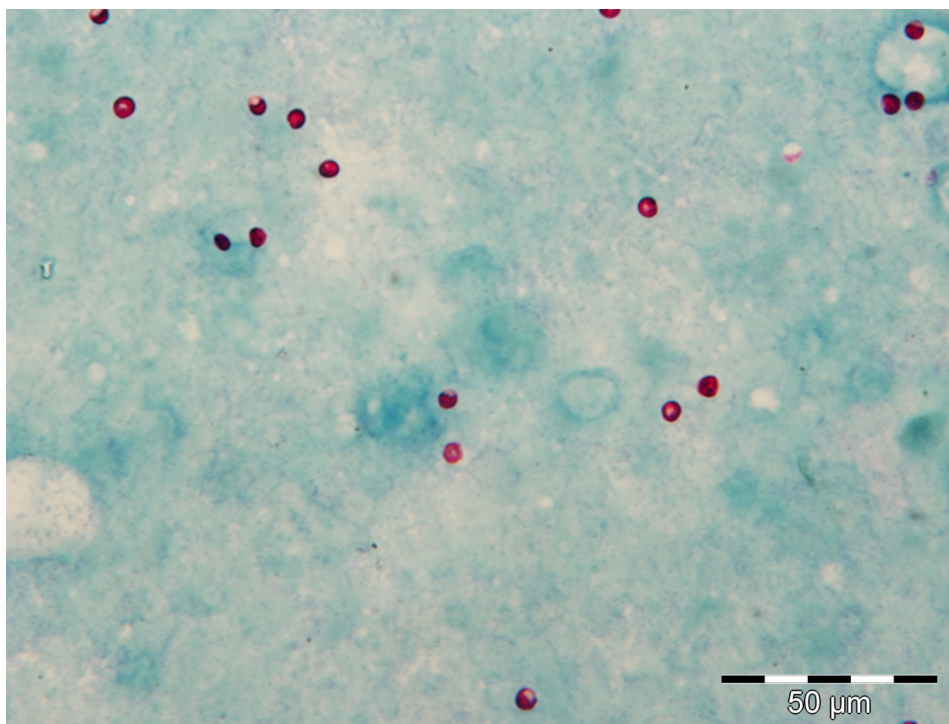
<b>Id campione</b>	<b>Categoria animale</b>	<b>Risultati Microscopia</b>	<b>Risultati PCR</b>	<b>Risultati RFLP</b>	<b>Risultati subtipizzazione</b>
1	AG	positivo	Negativo	-	-
2	AP	positivo	Negativo	-	-
3	AG	positivo	Positivo	<i>C. ubiquitum</i>	XIIa
5	AP	positivo	Negativo	-	-
7	ANP	positivo	Negativo	-	-
8	ANP	positivo	Negativo	-	-
10	AP	positivo	Negativo	-	-
11	ANP	positivo	Negativo	-	-
12	ANP	positivo	Negativo	-	-
13	AG	positivo	Positivo	<i>C. ubiquitum</i>	XIIa
14	ANP	positivo	Negativo	-	-
16	AG	positivo	Negativo	-	-
17	AG	positivo	Positivo	<i>C. parvum</i>	
18	AG	positivo	Positivo	<i>C. parvum</i>	
19	ANP	positivo	Negativo	-	-
20	AG	positivo	Positivo	<i>C. parvum</i>	IlaA15G2R1
21	AG	positivo	Positivo	<i>C. parvum</i>	IlaA15G2R1
22	ANP	positivo	Negativo	-	-
23	AG	positivo	Positivo	<i>C. parvum</i>	
24	AG	positivo	Negativo	-	-
25	AG	positivo	Positivo	<i>C. parvum</i>	IlaA15G2R1
26	AG	positivo	Positivo	<i>C. parvum</i>	IIdA20G1
27	AG	positivo	Positivo	-	-
28	ANP	positivo	Negativo	-	-
29	AP	positivo	Negativo	-	-
30	AG	positivo	Positivo	-	-
31	AG	positivo	Negativo	-	-
33	AG	positivo	Negativo	-	-
34	AG	positivo	Positivo	<i>C. parvum</i>	IlaA15G2R1
35	AP	positivo	Negativo	-	-
36	AG	positivo	Positivo	<i>C. ubiquitum</i>	XIIa
37	AG	positivo	Negativo	-	-
38	AG	positivo	Positivo	<i>C. parvum</i>	IlaA15G2R1
39	AG	positivo	Positivo	<i>C. ubiquitum</i>	XIIa



**Figura 1** - Oocisti di *Cryptosporidium* spp ottenute con colorazione di Ziehl-Neelsen modificata da Angus (1987), ingrandimento 4X.



**Figura 2** - Campo microscopico ad ingrandimento 40X utilizzato per il calcolo della media delle oocisti di *Cryptosporidium* spp.



## 2.2. FASE 2 - EPIDEMIOLOGIA E CARATTERIZZAZIONE BIOMOLECOLARE DELLE FORME MACROSCOPICHE E MICROSCOPICHE DI *SARCOCYSTIS* NEGLI OVINI DELLA SARDEGNA

### 2.2.1. Background

Sono quattro le specie di *Sarcocystis* (*Sarcocystis gigantea*, *Sarcocystis medusififormis*, *Sarcocystis tenella* and *Sarcocystis arieticanis*) che hanno come ospite intermedio riconosciuto l'ovino (Dubey et al., 1989). *S. gigantea* e *S. medusififormis* trasmesse dai felidi, sono generalmente considerate non patogene e producono cisti macroscopicamente visibili (Bahari et al., 2014), mentre *S. tenella* e *S. arieticanis*, che producono cisti microscopiche (Bahari et al., 2014), sono trasmesse dai canidi e sono considerate più patogene (Heckerth & Tenter, 1999).

Oltre a queste, due altre specie originariamente isolate dal capriolo, *Sarcocystis mihoensis* e *Sarcocystis gracilis*-like, sono state descritte anche nei piccoli ruminanti (Saito et al., 1997; Giannetto et al., 2005). I cani sono anche riconosciuti come ospiti definitivi di *S. mihoensis* ed insieme con le volpi di *S. gracilis*-like (Giannetto et al., 2005).

*S. tenella*, *S. gigantea* e *S. arieticanis* sono diffuse in tutto il mondo, mentre infezioni da *S. medusififormis* sono state riportate perlopiù in Australia, Nuova Zelanda, Iran e Italia (Heckerth & Tenter, 1999; Scala et al., 2008).

Gli ovini si infettano con i protozoi del genere *Sarcocystis* mediante l'ingestione di cibo o acqua contaminati da sporocisti.

La presenza di specie macroscopiche di *Sarcocystis* negli ovini causa grande preoccupazione nel settore dell'industria della carne poiché parte o perfino l'intera carcassa potrebbero essere escluse al consumo umano, provocando gravi perdite economiche (Dubey et al., 1988; Oryan et al., 1996). D'altra parte, le specie microscopiche, possono causare patologie negli animali infetti, specialmente nelle forme acute, e comportare perdite produttive (Fayer, 1976; Munday, 1979; Munday, 1986). La gravità della malattia negli ovini causata da *S. tenella* e *S. arieticanis* sembra essere correlata con la dose di sporocisti ingerita e con lo stato immunitario dell'ospite (Heckerth & Tenter, 1999). Durante la fase precoce di moltiplicazione dei parassiti mediante endopoligenia, l'infezione primaria con una delle specie di *Sarcocystis* può condurre a episodi di sarcosporidiosi acuta con encefalite, encefalomielite e diatesi emorragica che possono causare la morte dell'animale (Heckerth e Tenter, 1999). Nelle pecore in stato di gravidanza, l'infezione acuta da *Sarcocystis* provoca talvolta morte fetale, aborto o nascita prematura dell'agnello (Munday, 1981; Fayer & Dubey, 1988).

Gli ovini possono essere infettati contemporaneamente da differenti specie di *Sarcocystis*, patogene e non patogene (Gjerde, 2013). Il criterio più comunemente utilizzato per effettuare la classificazione delle diverse specie di *Sarcocystis*, è quello che si basa sulle caratteristiche ultrastrutturali della parete primaria delle sarcocisti (Giannetto et al., 2005). Diversi autori hanno riportato che la parete delle sarcocisti variano dagli organismi relativamente semplici a quelli altamente complessi (Dubey et al., 1988; Obendorf e Munday, 1987; O'Toole, 1987; Mehlhorn et al., 1975).

Tuttavia in questi ultimi anni per l'identificazione delle specie di *Sarcocystis* sono state messe a punto delle valide tecniche di biologia molecolare (Gjerde, 2013; Tenter, 1995). Gran parte degli studi molecolari sulle specie di *Sarcocystis* sono stati effettuati utilizzando unità di DNA ribosomiale, in particolare la piccola subunità del gene (18S) rRNA (Gjerde, 2013). Numerosi report sulla prevalenza della sarcosporidiosi ovina hanno rivelato che questa parassitosi è ancora comune anche nei Paesi sviluppati (Mirzaei and Rezaei, 2014; Mirzaei Dehaghi et al., 2013; Savini et al., 1992), in particolare nelle regioni dove viene ancora praticato l'allevamento ovino di tipo estensivo, come nei Paesi del Mediterraneo. Proprio in Sardegna, Scala e Nieddu (1990) riportarono una prevalenza del 66% per *S. gigantea*. Questa specie è comunemente riscontrata nell'esofago e in altri siti (come per esempio la muscolatura scheletrica, diaframma, cuore, lingua e laringe) degli ovini macellati (Bahari et al., 2014). Inoltre gli stessi autori riscontrarono cisti microscopiche con una prevalenza che oscillava tra 36% a 81% rispettivamente nell'esofago e nel cuore (Scala e Nieddu, 1990). Nonostante ciò, i dati sull'epidemiologia e la caratterizzazione biomolecolare delle sarcosporidiosi ovine sono piuttosto datati e principalmente presenti nella cd. "letteratura grigia", non fruibile per tutti (documenti regionali italiani e comunicazioni in sede di congresso).

Quindi, l'obiettivo di questo studio è stato quello di riempire il gap di conoscenza sulle sarcosporidiosi ovine mediante un'indagine trasversale sulle specie macroscopiche e microscopiche presenti negli ovini della Sardegna.

## **2.2.2 MATERIALI E METODI**

### **2.2.2.1 Sarcocisti macroscopiche**

Lo studio ha coinvolto un totale di 769 ovini di razza Sarda, di sesso femminile, con età compresa tra 3-7 anni macellate in 4 diversi mattatoi della Sardegna (1 = Thiesi, SS, n 282; 2 = Tula, SS, n 157; 3 = Settimo S. Pietro, CA, n 103; 4 = Nule, NU, n 227).

Subito dopo la macellazione, durante l'ispezione *post-mortem*, venivano esaminati il diaframma, i muscoli addominali ed intercostali, i muscoli pellicciai e i muscoli della coscia per il rilevamento delle cisti macroscopiche di *Sarcocystis* spp.

In una parte delle pecore macellate sono stati esaminati anche l'esofago (n=365) ed i muscoli laringei/pteroidei (n=521).

Le cisti macroscopiche sono state classificate secondo la classificazione riportata da Dubey et al. (1989).

Al fine di confermare la tassonomia delle cisti macroscopiche, è stato condotto uno studio biomolecolare su 30 cisti isolate durante l'esame macroscopico.

Le sarcocisti isolate sono state lavate per due volte con acqua distillata, collocate in Eppendorf da 1,5 ml, con etanolo al 70% e conservate a -20° C fino all'estrazione del DNA eseguita con un commerciale kit (PureLink® Genomic DNA Mini Kit - Invitrogen, USA), secondo le istruzioni del produttore. Sono stati amplificati i geni parziali dell'RNA ribosomiale 28S e 18S usando le coppie di primers KL5a (5'-GAC CCT GTT GAG CTT GAC 30) e KL2 (5 ACT TAG AGG CGT TCA GTC-3') e 1L (5'CCATGCATGTCTAAGTATAAGC-3') con 1H (5 'TATCCCCATCACGATG CATAAC-3') come descritto da Mugridge et al. (1999) e Yang et al. (2001). Ciascuna reazione di PCR è stata eseguita con un volume finale di 25 µl contenente 2,5 µl di PCR buffer 10 X, 2,5 µl costituito dal mix dNTP 2 mM, 0,1 µM di ogni primer, 0,5 µl di Taq (*Thermus aquaticus*) DNA Polymerase (Thermo Scientific), 2,5 µl di MgCl<sub>2</sub>, 0,2 µg di DNA genomico e il restante volume d'H<sub>2</sub>O. Dopo la prima fase di denaturazione a 94° C per 3 min, sono stati eseguiti 30 cicli di amplificazione a 94° C per 45 s e a 65° C (62° C per le coppie di primer 1L / 1H) per 45 s, un allungamento a 72° C per 1 min e un estensione finale a 72° C per 5 min.

Successivamente i prodotti della PCR sono stati purificati con un kit commerciale (High Pure PCR Product Purification Kit, Roche) e sequenziati attraverso un servizio esterno (MWG Eurofins). Le sequenze ottenute sono state confrontate con i database BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>).

### **2.2.2.2 Sarcocisti microscopiche**

Parallelamente, è stata condotta un'ulteriore ricerca per l'identificazione di *Sarcocystis* spp., su ulteriori 112 pecore di razza Sarda provenienti dagli stessi quattro stabilimenti di macellazione della Sardegna (1 = Thiesi, SS, n 40; 2 = Tula, SS, n 20; 3 = Settimo S. Pietro, CA, n 18; 4 = Nule, NU, n 34). Per l'identificazione microscopica di *Sarcocystis* spp., sono stati impiegati due diversi protocolli, che prevedevano rispettivamente l'utilizzo della microscopia ottica sui campioni non

conservati e l'uso di tecniche biomolecolari (PCR). Il cuore è stato scelto come matrice d'analisi secondo quanto indicato in precedenti studi (Pérez-Creo et al., 2013; Wheeler et al., 1987).

Nella prima fase tutti i campioni sono stati esaminati al microscopio ottico subito dopo la macellazione, allo scopo di rilevare la presenza di specie microscopiche di *Sarcocystis* come descritto da Fukuyo et al. (2002). Per ogni campione di cuore sono stati ottenuti due campioni di tessuto muscolare; uno dal setto atrioventricolare (AVS) e l'altro dal ventricolo sinistro (LV). Circa 0,5 g di muscoli (2 mm × 8 mm) sono stati tagliati, schiacciati tra due vetrini ed esaminati mediante microscopio ottico (100X) mentre altri 10 g di ciascun campione sono stati congelati per ulteriori indagini molecolari.

Per la successiva fase di indagine biomolecolare, sono stati prelevati 10 g di tessuto da tutti i 112 campioni di cuore. I campioni venivano sottoposti ad omogeneizzazione, dopodiché 0,05 g di ogni campione venivano utilizzati per l'estrazione del DNA tramite un kit commerciale (PureLink Genomic DNA Mini Kit - Invitrogen, USA).

Sul DNA estratto è stata eseguita una nested PCR che amplificava per la piccola sub unità ribosomiale 18S rRNA, come precedentemente descritto da Heckerroth e Tenter (1999).

La nested PCR (ST-nested-PCR) per *S. tenella* è stata realizzata usando una coppia di primers esterni ST1 (5' - GGA TCG CAT TAT GGT CAT-3' ) e AP2 (5' - CCC GGG ATC CAA GCT TGA TCC TTC TGC AGG TTC ACC TAC-3' ) e la coppia di primers interni 8 (5' -TTT GAC TCA ACA CGG G-3' ) e ST3 (5' CGT TGC CGC GCG TTA A-3' ). Per *S. arieticanis* la nested PCR è stata effettuata usando una coppia di primers esterni STA (5' -TTT CGC AAG GAA GAG GA -3' ) e SA2 (5' - TGA AAC GGC GCG TAG A-3' ) con i primers interni 2 (5' - AGG GTT CGA TTC CGG AG -3' ) e SA1 (5' - GCG GGA AGA GGA GAA T-3' ).

La PCR è stata eseguita in un volume finale di reazione di 100 µl contenente 10 mM di Tris-HCl, 50 mM di cloruro di potassio, 0,1% Triton X-100, 1,75 mM di cloruro di magnesio, 0,1 mM di ciascuno dei deossinucleotidi trifosfato (dNTP), 100 pmol di ogni primer e 1,5 U di Taq (*Thermus aquaticus*) DNA Polymerase (Thermo Scientific). Le amplificazioni sono state realizzate con il termociclatore GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA) utilizzando le seguenti condizioni riportate nel protocollo della PCR: iniziale denaturazione a 94° C per 4 min, 26 cicli a 93°C per 2 min, 57°C per 2 min, 72°C per 2 min, con uno step di estensione finale di 5 min per il completamento del processo

I prodotti della PCR sono stati separati sul gel agarosio all'1,5% e visualizzati dopo la colorazione con Gel Red per verificare la dimensione delle bande prodotte dalla PCR. Successivamente i campioni sono stati purificati mediante l'utilizzo del kit NucleoSpin Gel e PCR clean up (Machery-

Nagel, Germany) e inviati al sequenziamento presso un laboratorio esterno (EurofinsMWG Operon, Germania). Le Le sequenze ottenute sono state anche in questo caso confrontate con i database BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>).

I dati sono stati analizzati utilizzando il programma statistico Epi-Info (versione 7.0, CDC / WHO, Atlanta, GA, USA). Il test *chi*-quadrato ( $\chi^2$ ) è stato usato per determinare le differenze significative sulle prevalenze tra i diversi tessuti esaminati. Le differenze sono state considerate statisticamente significative quando il valore P è risultato < 0.05. La concordanza tra i test diagnostici (metodo microscopico vs PCR) è stato valutato usando il test statistico K.

## 2.2.3 RISULTATI

### 2.2.3.1 Sarcocisti macroscopiche

L'esame macroscopico degli organi ha permesso di evidenziare forme macroscopiche di *Sarcocystis* spp. nel 23,3% (179/769) delle carcasse esaminate. La prevalenza delle sarcosporidiosi nei 4 macelli dell'isola è riportata in dettaglio nella Tabella 1.

Sono stati isolati due differenti morfotipi:

- sarcocisti ovali (SO) grandi, con una lunghezza media di  $7308,5 \pm 1686,8 \mu\text{m}$  e una larghezza media di  $5421,25 \pm 1274,6 \mu\text{m}$  riconosciute come *S. gigantea* (Figura 1)
- sarcocisti fusiformi (SF) allungate e sottili, con una lunghezza media di  $7704,75 \pm 549,9 \mu\text{m}$  ed una larghezza media di  $170,25 \pm 30 \mu\text{m}$  localizzate in particolare nei muscoli scheletrici e riconducibili a *S. medusiformis* (Figura 2).

Le prevalenze dettagliate dell'infezione e le specie di *Sarcocystis* riscontrate nei tessuti esaminati sono mostrate nella Tabella 2 con i rispettivi valori di Odds Ratio.

Per quanto riguarda i differenti tessuti esaminati, l'esofago è risultato il tessuto più infetto (31,6%; 125/395), seguito dai muscoli addominali (20,4%; 157/769). Il confronto tra le prevalenze riscontrate per ciascun distretto corporeo sono risultate statisticamente significative ( $\chi^2$  con 6 gradi di libertà = 336.11;  $P < 0.05$ ). Le cisti macroscopiche classificate come SO sono state osservate perlopiù nell'esofago (31,6%; 125/395) mentre le cisti SF sono state rinvenute principalmente nei muscoli addominali (12,3%; 95/769). La differenza è risultata statisticamente significativa ( $\chi^2 = 63.36$ ;  $P < 0.05$ ).

Il DNA estratto dalle cisti macroscopiche SO (n = 5) e SF (n = 4) è stato utilizzato come modello per la caratterizzazione genetica dei due diversi tipi di sarcocistici macroscopiche. I tipi di sarcocisti SO sono state identificate come *S. gigantea* (mostrando un'omologia della sequenza nucleotidica

del 99% per entrambi i geni con le sequenze depositate nella banca dati GenBank rispettivamente da Mugridge et al. (1999) e Gjerde (2013) (numero di accesso di GenBank: U85706.1 e KC209733.1). Le sarcocisti SF potrebbero essere riconducibili a *S. medusiformis* così come descritto da Dubey et al. (1989) e Tenter (1995) nonostante le sequenze non possano essere confrontate, in quanto non sono presenti su GenBank sequenze derivate da *S. medusiformis*. Le sarcocisti di tipo SF hanno mostrato inoltre una scarsa omologia (94%) con *S. gigantea* e *S. moulei* per entrambi i geni. Tutte le sequenze ottenute da *S. gigantea* e *S. medusiformis*-like sono state inserite in GenBank ed ad esse sono stati assegnati i numeri di accesso (Genbank ID: KX223753; KX223754).

### 2.2.3.2 Sarcocisti microscopiche

L'esame microscopico ha consentito di riscontrare sarcocisti nel 77,7% (87/112) dei campioni di cuore esaminati. Non è stata osservata alcuna differenza statistica tra le prevalenze riportate per i due siti esaminati, AVS (63,4%; 71/112) e LV (51,8%; 58/112) ( $\chi^2 = 3,09$ ;  $P > 0,05$ ). Nella tabella 2 sono riportate le prevalenze dettagliate dell'infezione riscontrata nei diversi stabilimenti di macellazione.

L'analisi molecolare dei campioni di cuore ha consentito di identificare le specie microscopiche *S. tenella* e *S. arieticanis*, con prevalenze rispettivamente del 95,5% (107/112) e del 17,8% (20/112); la differenza tra le prevalenze delle due specie è stata statisticamente significativa ( $\chi^2 = 137,63$ ;  $P < 0,05$ ).

L'allineamento delle nostre sequenze con BLAST ha mostrato un'omologia del 100% e del 99% tra le sequenze ottenute dai nostri campioni (Genbank ID KX223751; KX223752) e quelle disponibili in GenBank per *S. tenella* (KP263759.1) e *S. arieticanis* (L24382.1).

Il 74,1% (83/112) dei campioni di cuore esaminati è risultato positivo sia alla microscopia ottica che alla PCR, mentre il 21,4% (24/112) dei campioni è risultato positivo alla PCR ma negativo alla microscopia ottica, e infine, il 3,6% (4/112) dei campioni di cuore è risultato positivo alla microscopia ottica ma negativo alla PCR.

Il confronto tra i due test tramite il test di Kappa ha mostrato che non c'è stata concordanza tra i due test ( $K < 0,01$ ).

### 2.2.4 DISCUSSIONE

I risultati ottenuti nel presente studio indicano una prevalenza estremamente elevata (fino al 95,5% per *S. tenella*) delle sarcosporidiosi negli ovini sardi regolarmente macellati per il consumo umano.

La classificazione morfologica delle sarcocisti ci ha consentito di identificare due forme macroscopiche identificate come SO e SF con caratteristiche morfologiche paragonabili a quelle descritte da Dubey et al. (1989) e Tenter (1995) rispettivamente per *S. gigantea* e *S. medusiformis*. Le cisti SO sono state localizzate principalmente nell'esofago (57%) mentre le cisti SF nei muscoli addominali (12.3%). Questo risultato concorda con quelli riportati da altri autori (Oryan et al., 1996) e suggerisce che durante l'ispezione ufficiale delle carcasse nei macelli, i muscoli addominali dovrebbero essere controllati scrupolosamente dal veterinario ufficiale al fine di rilevare la presenza di sarcosporidiosi, dato che le cisti fusiformi sono generalmente molto sottili (8 x 0,2 mm) e disposte nel senso delle fibre muscolari per cui potrebbero passare inosservate ad un esame non approfondito (Dubey et al., 1989). Inoltre l'esofago, sebbene consenta di rilevare un gran numero di infezioni, non sempre viene sottoposto ad una dettagliata ispezione post-mortem, in quanto facente parte della corata, destinata automaticamente alla distruzione.

Le tecniche molecolari applicate ai due morfotipi hanno consentito di caratterizzare, per la prima volta nell'isola, le cisti SO come *S. gigantea* mentre non è stato possibile confermare la descrizione morfologica delle cisti SF come *S. medusiformis* a causa della mancanza delle sequenze nucleotidiche nella banca dati.

Inoltre con questa indagine è stato possibile segnalare e caratterizzare mediante la biologia molecolare, per la prima volta in Sardegna, la presenza delle due specie microscopiche, *S. tenella* e *S. arieticanis*.

È importante sottolineare i buoni risultati ottenuti con la microscopia ottica senza l'uso di coloranti (77,7% delle prevalenze vs 95,5% alla nested PCR;  $\chi^2$  Yates = 13,89; P < 0,05). Questa tecnica semplice, poco costosa e rapida potrebbe costituire un utile strumento adatto alle pratiche di laboratorio di routine, soprattutto in caso di limitata disponibilità economica. D'altro canto la PCR aumenta notevolmente la sensibilità di rilevazione delle specie di *Sarcocystis* contribuendo ad una maggiore precisione diagnostica (Mirzaei Dehaghi et al., 2013). La specificità della sub unità 18S dell'rRNA è stata confermata da molti autori che lo hanno considerato un potente strumento per la differenziazione specie-specifica delle specie di *Sarcocystis* nell'ovino (Heckeroth e Tenter, 1999). Nel presente studio è stata evidenziata con un'alta prevalenza (pari al 95,5%) *S. tenella*, nota come una delle specie più patogene negli ovini (Dubey, 1988). Risultati analoghi sono stati precedentemente riportati in altri Paesi: 91,7% in Romania (Titilincu et al., 2008); 86,5% in Turchia (Beyazit et al., 2007), 94,8% in Francia (Diéz-Baños, 1978), 87,6% in Slovacchia (Mala e Baranova, 1995) 96,9% in Mongolia (Fukuyo et al., 2002); 97,0% in Iraq (Latif et al., 1999); e il 76% in una precedente indagine in Italia (Giannetto et al., 2005).



Le elevate prevalenze delle specie microscopiche, notoriamente più patogene, potrebbero avere un importante impatto sull'allevamento ovino a causa degli effetti negativi sulla crescita e sull'incremento ponderale degli animali e il loro ruolo come agenti abortigeni (Munday, 1979, 1986; Fayer e Dubey, 1988).

Non va inoltre sottovalutata la notevole prevalenza delle forme macroscopiche, le quali possono dar luogo ad importanti ripercussioni di tipo ispettivo. Infatti, in base alla normativa vigente, l'infestazione massiva della carcassa la rende non idonea al consumo umano e dovrebbe pertanto implicarne la distruzione (Reg. CE 854/2004).

L'elevata prevalenza delle specie di *Sarcocystis* trasmesse dai felidi (*S. gigantea* e *S. medusiformis*) evidenzia lo stretto contatto tra l'ovino e il gatto, fattore di rischio anche per l'insorgenza di infezioni quali la toxoplasmosi, di estrema importanza sia per la pericolosità nei confronti dell'uomo, sia per le perdite economiche che determina nell'allevamento ovino, come causa frequente di aborto (Dubey et al., 2009). Il monitoraggio delle sarcocisti macroscopiche può dunque essere considerato un marker per la possibile presenza di *Toxoplasma gondii* in allevamento.

Sebbene le specie di *Sarcocystis* che colpiscono l'ovino non determinino un rischio zoonosico per l'uomo, il consumo di carne ovina cruda può esporre il consumatore alla sarcotossina (o sarcocistina), frazione proteica tossica che si libera in seguito alla rottura della parete della sarcocisti (Sasha et al., 1985). Le sarcocisti di *S. gigantea* contengono una sarcotossina molto potente, che ha effetti letali se inoculata nel ratto (Al-Tae e Al-Hyali, 2007) e nel coniglio (Brose et al., 1989). Queste tossine risultano termolabili, per cui è consigliata la cottura con temperature di almeno 70°C per rendere le carni ovine sicure per il consumo umano (Al-Hyali et al., 2010). Non esistono dati riguardanti l'eventuale pericolosità dei salumi e insaccati a base di carne ovina e caprina, che in Sardegna sono sempre più diffusi.

## 2.2.5 TABELLE E FIGURE

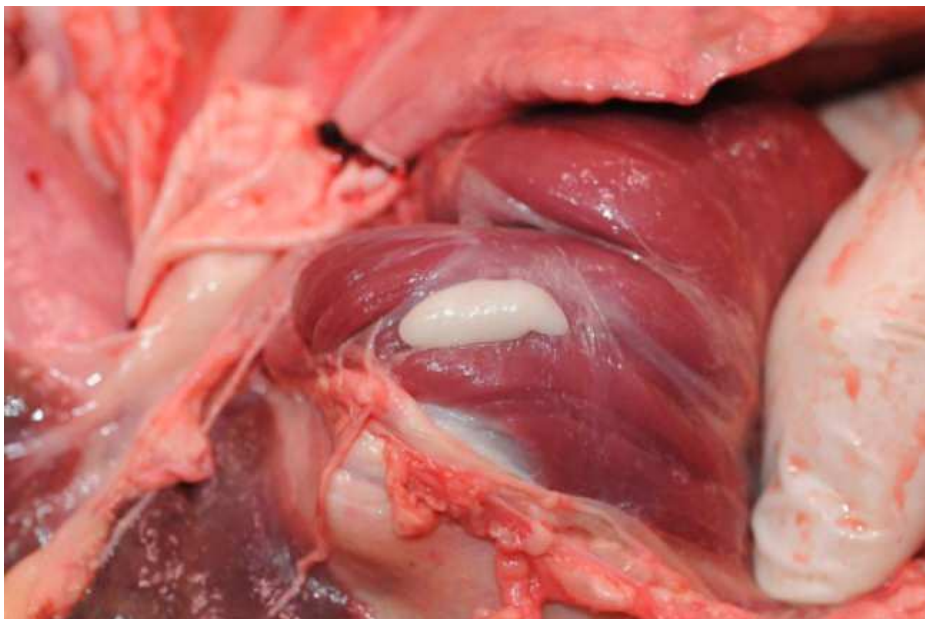
**Tabella 1** - Prevalenza dell'infezione da *Sarcocystis* spp. nei vari distretti muscolari.

Muscoli	Ovini esaminati	Positivi	P %	Odds ratio	% SO	% SF
Mm superficiali della coscia	769	15	2,0	0,3	0,8	1,7
Diaframma	769	44	5,7	1,00	2,2	4,0
Mm pellicciai	769	63	8,2	1,47	0,0	8,2
Mm intercostali	769	64	8,3	1,50	3,6	6,1
Mm addominali	769	157	20,4	4,23	11,7	12,3
Mm laringei/pteroidei	521	84	16,1	3,17	16,1	1,5
Esofago	395	125	31,6	7,63	31,6	1,3

**Tabella 2** - Prevalenza delle sarcocisti macroscopiche e microscopiche nei diversi mattatoi della Sardegna.

Mattatoio	Indagine forme macroscopiche			Indagine forme microscopiche		
	Ovini esaminati	Positivi	P %	Ovini esaminati	Positivi	P %
1	282	55	19,5	40	29	72,5
2	157	34	21,6	20	16	80,0
3	103	26	25,2	18	14	77,8
4	227	64	28,2	34	28	82,3
Analisi statistica	$\chi^2$ con 3 gradi di libertà = 5,78; P > 0,05			$\chi^2$ con 3 gradi di libertà = 1,11; P > 0,05		

**Figura 1** - Sarcocisti macroscopiche da *S. gigantea* nei muscoli laringei/pteroidei.



**Figura 2** - Sarcocisti macroscopiche da *S. medusiformis* nei muscoli della parete addominale



## **2.3. FASE 3 - VALUTAZIONE DELLA PRESENZA DELLA GIARDIOSI NEGLI OVINI DELLA SARDEGNA E IDENTIFICAZIONE DEGLI ASSEMBLAGGI COINVOLTI NELLA MALATTIA OVINA**

### **2.3.1 Background**

I dati di prevalenza della giardiosi nell'ovino riportati in letteratura sono molto variabili nei diversi Paesi del mondo.

Le numerose indagini effettuate nell'emisfero occidentale mostrano valori di prevalenza che variano dall'11,1 al 44,0% in Australia (Nolan et al., 2010; Ryan et al., 2005; Yang et al., 2009), al 25,4% negli Stati Uniti (Santin et al., 2007), fino a valori molto elevati (55,6%) in Messico (Di Giovanni et al., 2006).

Anche la situazione in Europa riflette la stessa variabilità, dai valori molto bassi (1,3%) riscontrati in Polonia (Bajer, 2008), al 16,8% in Repubblica Ceca (Strnadová et al., 2008), dal 21 al 22,2% in Polonia (Stojceki et al., 2015a; 2015b), al 25,5% riportato in Belgio (Geurden et al., 2008), al 26,8% in Norvegia (Robertson et al., 2010), e dal 19,2 al 42% in Spagna (Castro-Hermida et al., 2006, 2007; Gomez-Munoz et al., 2009).

In Italia, solo due studi hanno fornito dati epidemiologici sull'infezione nell'ovino: un primo studio condotto in Sicilia, che riportava una prevalenza del 17,6 % su un totale di 596 ovini esaminati (Virga et al., 1998), e uno studio più recente (Giangaspero et al., 2005) che riportava una prevalenza nettamente inferiore nell'Italia Centrale (1.5 % su 525 animali).

Dato il potenziale rischio per la salute pubblica della giardiosi dovuta alla contaminazione dell'acqua e del cibo, è molto importante conoscere non solo la prevalenza ma soprattutto determinare con certezza i genotipi di *G. duodenalis* circolanti, dato che non tutti i genotipi sono pericolosi per l'uomo (Monis et al., 1999; Monis e Thompson, 2003).

Negli ovini sono state riportate infezioni causate da tre diversi genotipi di *G. duodenalis*, in particolare gli assemblaggi zoonotici A e B (Giangaspero et al. 2005; Aloisio et al., 2006; Yang et al., 2009; Robertson et al., 2010) e l'assemblaggio ospite-specifico E (Ryan et al., 2005; Santín et al., 2007; Geurden et al., 2008).

Per quanto riguarda la caratterizzazione biomolecolare degli isolati ovini in Italia, oltre all'assemblaggio E ospite-specifico, sono state riportate infezioni determinate dai genotipi AI (Giangaspero et al., 2005) e BI (Aloisio et al., 2006) dei quali è noto il potenziale zoonotico.

Un interessante studio condotto in Australia (Yang et al., 2015) mostra la presenza di cisti di *Giardia* con una prevalenza intorno al 5%, in diversi mercati di bestiame, in cui venivano venduti

ovini da carne, e nelle acque reflue di un mattatoio. Questo studio risulta particolarmente importante in quanto fornisce sia la prevalenza relativa al periodo pre-macellazione, in cui animali di diversa provenienza vengono radunati insieme e sottoposti a situazioni potenzialmente stressanti che possono favorire l'eliminazione di cisti; inoltre mostra la presenza del protozoo anche nelle acque reflue del mattatoio, che possono andare a contaminare l'ambiente circostante. Talvolta infatti queste vengono riutilizzate dopo trattamento addirittura all'interno degli stessi mattatoi, andando a costituire una possibile fonte di inquinamento delle carcasse (Barros et al., 2007).

Per quel che concerne il ruolo patogeno di *G. duodenalis* negli ovini, l'infezione determina diarrea e ritardo nella crescita degli agnelli infetti, sebbene in molti studi non vengano riportate manifestazioni cliniche o patologiche (Xiao, 1994).

In agnelli sperimentalmente infetti sono stati riportati effetti negativi sulla crescita, con uno scarso aumento di peso e una riduzione del peso della carcassa al momento della macellazione (Olson et al., 1995). *G. duodenalis* può causare sindromi da malassorbimento negli agnelli, e di conseguenza perdite economiche nell'allevamento ovino (Aloisio et al., 2006).

Lo scopo della presente indagine è stato pertanto condurre uno studio epidemiologico e biomolecolare sulla giardiosi negli ovini della Sardegna, al fine della valutazione dell'importanza zootecnica dell'infezione e dell'eventuale rischio zoonosico.

## **2.3.2 MATERIALI E METODI**

### **2.3.2.1 Campionamento**

Per valutare la diffusione di *G. duodenalis* negli ovini della Sardegna, sono stati esaminati in totale 915 campioni coprologici, provenienti da 61 allevamenti siti in tutto il territorio regionale. Il campionamento ha avuto luogo durante la principale stagione dei parti 2015/2016 (novembre 2015/febbraio 2016) su tre differenti categorie di ovini:

- agnelli in lattazione di età inferiore a 30 giorni;
- pecore adulte nell'ultimo mese di gravidanza;
- pecore adulte che avevano partorito da massimo 30 giorni.

I campioni coprologici venivano ottenuti su ogni soggetto tramite prelievo rettale, debitamente contrassegnati, riposti in un contenitore refrigerato a 4°C e quindi trasportati entro 24h dal prelievo presso il laboratorio di Parassitologia dell'ODV del Dipartimento di Medicina Veterinaria di Sassari per essere sottoposti ad analisi.

Per ciascuna categoria sono stati prelevati 305 campioni, in particolare in ciascuno dei 61 allevamenti oggetto dello studio venivano prelevati campioni, 5 per ogni categoria di soggetti.

Ogni campione coprologico al momento del campionamento veniva classificato in base alla sua consistenza in tre differenti classi:

- 1) feci normali (feci secche disidratate scarsamente cedevoli al tatto negli agnelli o pellet fecali evidenti nelle pecore);
- 2) feci pastose (feci facilmente cedevoli al tatto o pellet non conformati nelle pecore);
- 3) feci liquide/diarroiche.

### **2.3.2.2 Analisi microscopica**

In laboratorio i campioni venivano analizzati per il riscontro diretto di cisti di *G. duodenalis*, tramite una metodica di filtrazione e successiva flottazione in centrifuga con una soluzione di Solfato di Zinco (Tecnica di Wisconsin). Le fasi principali di questa tecnica prevedevano l'utilizzo di un campione di feci di almeno 1 - 3 grammi, che veniva stemperato in un barattolo con 10 ml di Solfato di Zinco ( $ZnSO_4$ , p.s.:1200) e sciolto accuratamente.

Successivamente le feci venivano filtrate con una garza e trasferite in un altro barattolo, da cui, con l'ausilio di una pipetta Pasteur venivano prelevati 2 ml del liquido filtrato e trasferiti in una provetta. La provetta veniva poi completamente riempita con  $ZnSO_4$  fino a formare un menisco positivo, sul quale veniva poggiato un vetrino coprioggetto 24 X 24.

Le provette venivano centrifugate a 2000 rpm per 10 minuti, al termine dei quali il vetrino coprioggetto veniva prelevato e appoggiato su un vetrino portaoggetto, con l'aggiunta di una goccia di colorante di Lugol, necessario per la messa in evidenza di cisti di *G. duodenalis*. (Figura 4).

Il vetrino veniva esaminato al microscopio ottico partendo dall'ingrandimento minore fino a 20X.

In considerazione della scarsa quantità di feci ottenibile da ciascun agnello, per la ricerca delle cisti di *G. duodenalis* le analisi venivano effettuate su questa categoria di soggetti ricostituendo un pool dai cinque campioni fecali degli agnelli per ogni azienda, allo scopo di riuscire a ottenere quantomeno una positività aziendale per questa categoria di soggetti.

### **2.3.2.3 Indagine biomolecolare**

Per l'indagine biomolecolare 4 campioni risultati positivi a *G. duodenalis* venivano sottoposti all'estrazione del DNA utilizzando il kit commerciale QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, Germany). Ciascun campione di feci veniva sottoposto a 3 cicli di congelamento in azoto liquido (-196°C per 1 minuto) e scongelamento (100°C per 5 minuti) con lo scopo di frammentare la spessa parete cistica di *G. duodenalis* ed incrementare il rendimento del processo di estrazione del DNA. Il DNA estratto veniva stoccato a -20°C fino alla successiva fase di PCR.

I campioni di DNA estratti venivano sottoposti ad una Nested PCR specifica per un tratto di ~175bp della regione prossima alla terminazione 5' del gene 16S-rRNA di *Giardia*. Nel primo step sono stati utilizzati i primers RH 11 (forward; 5' –CAT CCG GTC GAT CCT GCC -3') e RH 4 (reverse; 5'-AGT CGA ACC CTG ATT CTC CGC CAG G-3') (Hopkins et al., 1997), nel secondo step i primers interni Giar-F: 5' –GAC GCT CTC CCC AAGGAC-3' e Giar-R: 5' –CTG CGT CAC GCT GCT CG-3' (Read et al. 2002). Ciascuna reazione di PCR veniva condotta in un volume finale di 25µl contenente PCR buffer (1X), MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM), dNTPs (0,2 mM di ognuno), primer FOR (0,2 µM), primer REV (0,2 µM), 1 U di Taq polimerasi (Invitrogen), DNA, H<sub>2</sub>O milliq.

Per quanto riguarda i parametri di reazione sono stati utilizzati per entrambi gli step le seguenti condizioni: denaturazione a 94°C per 7 minuti, seguita da 35 cicli di amplificazione con denaturazione a 95°C per 30 secondi, annealing a 65°C per 30 secondi, amplificazione a 72°C per 30 secondi, estensione finale a 72°C per 10 minuti.

Tutte le reazioni di amplificazione venivano effettuate in un termocicizzatore GeneAmp PCR System 2007 (Applied Biosystems).

Gli amplificati ottenuti dalla Nested PCR venivano sottoposti a elettroforesi in gel di agarosio all'1% in tampone TAE 1X (Tris-Acetato 40mM, Na<sub>2</sub>EDTA 0,1 Mm, pH 8) e Sybr Safe DNA gel stain (Invitrogen). La visualizzazione dei risultati e l'acquisizione dell'immagine veniva effettuata mediante lo strumento UVITEC (Cambridge). La stima della lunghezza del frammento veniva effettuata mediante l'utilizzo dello standard di pesi molecolari Thermo Scientific GeneRuler (100 bp DNA ladder).

### 2.3.3 RISULTATI

Nessun animale adulto esaminato nelle categorie delle pecore nel periodo post parto ed in quelle in gravidanza è risultato positivo per *G. duodenalis*.

Dall'analisi dei campioni provenienti dagli agnelli è stato possibile rilevare l'infezione da *G. duodenalis* nel 6,6 % (4/61) degli allevamenti monitorati.

Il numero di cisti rinvenuto all'esame microscopico era molto contenuto (Figura 1), sono state osservate infatti in media 1-2 cisti per campo microscopico a 20X (Figura 2); solo in un caso si sono riscontrate 5/6 cisti per campo.

Il basso numero di campioni positivi, non ha consentito di effettuare un'analisi dei fattori di rischio per l'infezione.

I risultati ottenuti attraverso la Nested PCR ed il successivo sequenziamento hanno permesso di isolare l'assemblaggio AI di *G. duodenalis*.

#### 2.3.4 DISCUSSIONE

I dati ottenuti dalla nostra indagine su *G. duodenalis* hanno evidenziato come la giardiosi sia attualmente presente negli allevamenti ovini della Sardegna. I valori di prevalenza non sono risultati elevati (6,6% degli allevamenti monitorati), ma il protozoo è stato evidenziato esclusivamente in categorie di animali a rischio, come gli agnelli.

La positività di 4 allevamenti ovini, significa che almeno 4 degli agnelli esaminati presentavano un'infezione da *G. duodenalis* (uno per ciascun pool positivo), pertanto la prevalenza individuale è stata stimata essere maggiore o uguale all'1,3%, in linea quindi con quanto riportato da Giangaspero et al. (2005).

La presenza di *G. duodenalis* è stata riscontrata limitatamente alla categoria degli agnelli, in analogia anche con Olson et al. (1997), che evidenzia una maggior sensibilità degli animali giovani rispetto ai capi adulti. I motivi di tale maggiore suscettibilità vanno probabilmente ricercati nella minor efficacia della risposta immunitaria in questa categoria di soggetti, così come già sostenuto da altri autori (Castro-Hermida et al., 2011).

Tuttavia sono presenti in letteratura altre indagini nelle quali si sono registrati dei tassi di prevalenza più elevati in agnelli svezzati e in ovini adulti (Santìn et al., 2007; Wang et al., 2016).

La maggior recettività registrata nei confronti di *G. duodenalis* negli ovini adulti, secondo Yang et al. (2009) può dipendere da situazioni stagionali e di stress dei soggetti monitorati; lo studio in questione infatti si trattava di campioni raccolti da soggetti adulti ricoverati nella stalla in un macello per cui questi autori ipotizzano che lo stress del raduno, del trasporto e della stabulazione possano aver determinato un aumento nell'eliminazione di cisti da parte degli animali positivi, e quindi una maggiore contaminazione ambientale.

La giardiosi ovina, sembrerebbe quindi scarsamente diffusa in Sardegna, e in ogni caso limitata agli agnelli e in grado di determinare un'infezione non particolarmente grave. Tutto questo è in analogia anche a quanto riscontrato in un'indagine simile condotta da Giangaspero et al. (2005) su agnelli e pecore adulte dell'Abruzzo, in cui era stata riscontrata una prevalenza dell'1,5% (5/325), e anche in questo caso i soggetti positivi erano tutti agnelli di età inferiore ai 2 mesi. Ben diversi sono i valori di prevalenza riportati in Sicilia circa venti anni fa, in cui, su 596 ovini destinati alla macellazione, il 17,6% risultava positivo a *G. duodenalis* (Virga et al., 1998).

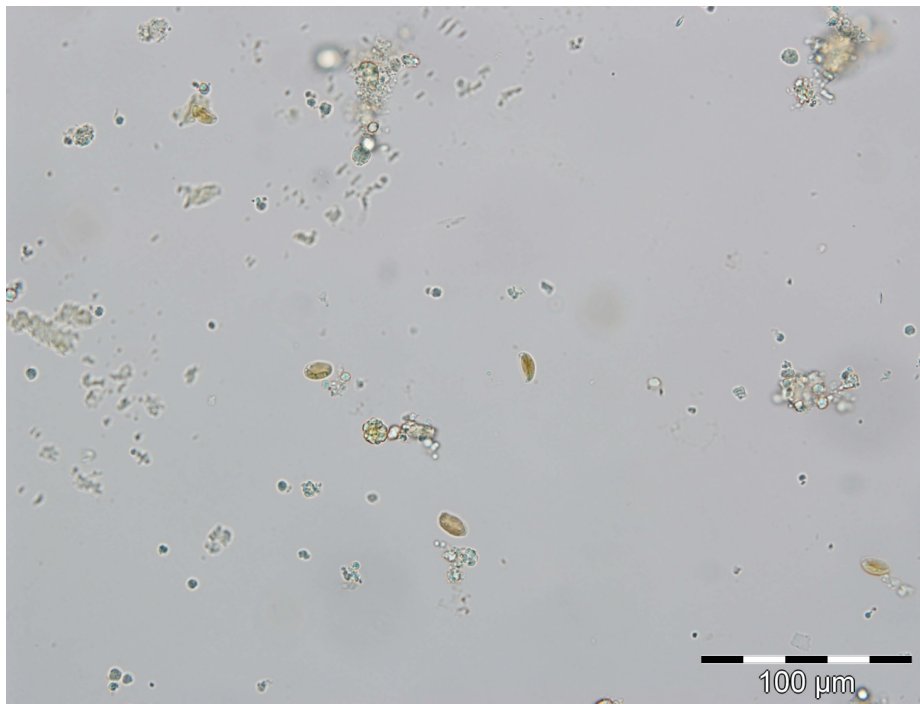


L'analisi biomolecolare dei campioni positivi da noi riscontrati, ha permesso di identificare l'assemblaggio AI. Tale risultato risulta in linea con quanto riportato da Giangaspero et al. (2005) in Abruzzo; gli autori hanno isolato per la prima volta l'assemblaggio AI come genotipo di *G. duodenalis* responsabile dell'infezione negli ovini in Italia (Giangaspero et al., 2005).

Aloisio et al. (2006) riportano invece un caso di grave sindrome da malassorbimento, calo di peso, emissione di feci malformate raramente diarroiche, che ha coinvolto un gruppo di 450 agnelli di età compresa tra i 30 e i 90 giorni. Dopo il decesso di tre animali sono state compiute approfondite analisi che hanno portato all'identificazione di *G. duodenalis* quale responsabile dell'episodio, e inoltre le sequenze ottenute dall'analisi biomolecolare hanno mostrato una stretta omologia con l'assemblaggio B, più precisamente con il sottotipo B1, precedente riscontrato in infezioni umane e in contaminazioni ambientali (Thompson e Monis, 2004).

### 2.3.5 FIGURE

**Figura 1** - Cisti di *Giardia duodenalis* ottenute mediante flottazione, ingrandimento 10X.



**Figura 2** – Campo microscopico a 20X, utilizzato per calcolare la media delle cisti di *Giardia duodenalis* nei campioni esaminati.



## CONCLUSIONI

Il presente lavoro apporta un sostanziale contributo alla conoscenza dell'epidemiologia di criptosporidiosi, giardiosi e sarcosporidiosi negli ovini della Sardegna, colmando il *gap* di conoscenza che riguardava questi protozoi, due dei quali di interesse zoonosico (criptosporidiosi e giardiosi), e le loro effettive implicazioni sullo stato zootecnico-sanitario del comparto ovino in Sardegna.

In particolare è stato evidenziato come *Cryptosporidium* spp. sia presente nel 34,4% degli allevamenti ovini sardi monitorati e nel 10,1% dei campioni analizzati. Questo protozoo coinvolge in modo significativo soprattutto gli agnelli (16,4%), rispetto alle pecore nel periodo post parto (6,6%) e quelle in gravidanza (7,2%), confermando la correlazione negativa tra l'età e i tassi di prevalenza.

Inoltre sebbene siano state riscontrate maggiori positività in campioni di feci liquide/diarroiche, non bisogna trascurare gli animali che seppur non mostrando turbe dell'apparato digestivo (5,7%) contribuiscono al mantenimento dell'infezione in allevamento.

L'analisi del genotipo e la sottotipizzazione ha consentito di rilevare le specie zoonotiche *C. parvum*, sottotipo IIa e IIc, e *C. ubiquitum*, sottotipo XIIa, dando prova del fatto che gli ovini in Sardegna potrebbero rappresentare una potenziale fonte di infezione per l'uomo.

La presenza di sarcocisti macroscopiche e microscopiche negli ovini della Sardegna rappresenta un importante dato epidemiologico, inoltre la loro presenza sembra avere una distribuzione uniforme in tutta l'isola. La bassa prevalenza delle sarcosporidiosi macroscopiche (23,3%), che hanno come ospite definitivo il gatto, rispetto a quelle microscopiche (95,5%), che hanno come ospite definitivo il cane, può essere spiegata dal fatto che a causa del tipo di allevamento le pecore sarde hanno più contatti con i cani, che vengono impiegati normalmente per la custodia del gregge, rispetto ai gatti, che invece gravitano preferenzialmente intorno alle strutture murarie delle aziende (ovili e capannoni).

Sebbene le specie macroscopiche sembra abbiano un ruolo patogeno marginale, la loro presenza nei vari organi può provocare importanti perdite economiche nell'industria della macellazione, poiché il riscontro di una massiva infestazione durante l'ispezione sanitaria post-mortem della carcassa ne

determina l'esclusione dal consumo umano. D'altro canto, le elevate prevalenze delle specie microscopiche potrebbero avere un importante impatto sulla produzione degli ovini a causa degli effetti negativi sulla crescita e sull'incremento ponderale degli animali, oltre a poter arrecare danni non sottovalutabili dovuti al loro ruolo di agenti potenzialmente abortigeni.

Meno preoccupante risulta essere la situazione zootecnico-sanitaria riferibile alla giardiosi. L'infezione infatti, oltre ad essere stata riscontrata con una bassa prevalenza (6,6% degli allevamenti monitorati), sembra coinvolgere solamente gli agnelli, e non sembra determinare importanti problemi sanitari, in virtù della sua scarsa diffusione e dello scarso numero di cisti rilevate nei campioni. Tuttavia l'identificazione dell'assemblaggio AI tra i campioni esaminati rappresenta un dato importante dal punto di vista della salute pubblica in quanto gli agnelli della Sardegna potrebbero rappresentare una potenziale fonte di trasmissione per l'uomo. Infatti l'elevato numero di soggetti allevati in Sardegna, che vengono poi "concentrati" all'atto della macellazione, che avviene intorno ai 30-40 giorni di vita, può comportare ad esempio presso i mattatoi degli importanti situazioni maggiormente a rischio di contaminazione ambientale.

Le metodiche diagnostiche utilizzate in laboratorio hanno dato degli ottimi risultati per quasi tutte le specie oggetto di studio, eccetto per *G. duodenalis* negli agnelli, per cui sono state riscontrate non poche difficoltà, dovute all'esigua quantità di campione prelevato, che non ha consentito di poter concentrare le feci in modo ottimale e quindi di avere un'adeguata quantità di DNA per poter effettuare un'agevole determinazione degli assemblaggi. In particolare l'esigua quantità di feci prelevabile in individui molto giovani ha costretto ad utilizzare un protocollo diagnostico su pool di cinque animali, diluendo quindi la quantità di cisti presenti nel campione analizzato successivamente in laboratorio.

I risultati ottenuti nel presente studio rimarcano la necessità di stabilire appropriate misure di monitoraggio e controllo al fine di arginare la diffusione di questi parassiti tra la popolazione ovina della Sardegna. Queste misure andrebbero in primo luogo a beneficio del settore zootecnico ovino, sia da un punto di vista prettamente sanitario, con il miglioramento delle condizioni di salute e di benessere animale, sia da un punto di vista zootecnico-economico, con la riduzione delle perdite dovute allo scarso incremento di peso alla macellazione nel caso di criptosporidiosi e giardiosi, e di quelle dovute all'esclusione dal commercio delle carni parassitate nel caso della sarcosporidiosi. In secondo luogo tali misure andrebbero a beneficio della salute umana, con la riduzione della contaminazione ambientale e di conseguenza delle fonti di contagio per l'uomo.

Per quanto riguarda la criptosporidiosi e la giardiosi sarebbe auspicabile in primo luogo il monitoraggio coprologico degli agnelli, in modo da stabilire se l'infezione sia presente nell'allevamento in maniera da eventualmente applicare un'adeguata strategia di controllo. Mentre per la giardiosi si sono rivelate efficaci terapie a base di fenbedazolo a una dose di 10 mg/kg per tre giorni consecutivi (Xiao et al., 1996; O'Hadley et al., 1997, Aloisio et al., 2007), in Italia non esistono farmaci registrati per il trattamento della criptosporidiosi negli agnelli (Mariano et al., 2014). Sebbene alcuni prodotti si siano dimostrati efficaci in fase sperimentale (ad es. alofuginone lattato e paromomicina solfato), il controllo della criptosporidiosi è affidato tuttora soprattutto a misure profilattiche quali pulizia a caldo e ad alta pressione dei locali, disinfezione con ammoniacca, vuoto sanitario, allevamento in box molto puliti, isolamento degli animali malati e separazione degli animali in base alle classi di età (Chartier, 2002; Mariano et al., 2014).

Si rende necessaria inoltre la formazione di veterinari e addetti ai lavori, affinché effettuino controlli (esami coprologici specifici e mirati) volti a conoscere la distribuzione di queste infezioni nelle aziende di tutto il territorio, ma anche l'informazione degli stessi sui reali rischi per la salute umana affinché possano applicare misure igieniche mirate per prevenirne la trasmissione alle categorie più suscettibili. In letteratura sono presenti casi di trasmissione indiretta della criptosporidiosi: in un recente studio è stata descritta la trasmissione zoonotica dell'infezione ad un bambino, ed è stata dimostrata la correlazione con un focolaio di criptosporidiosi ovina nell'azienda di un familiare (Cacciò et al., 2013).

Al monitoraggio di queste infezioni in allevamento, è necessario associare il controllo della contaminazione ambientale, fondamentale se si considera l'estrema resistenza delle forme di propagazione di questi protozoi alle comuni condizioni atmosferiche e ai comuni processi di sanitizzazione delle acque. È stata infatti riportata la presenza di questi protozoi nelle acque di alcuni impianti di trattamento delle acque reflue in varie regioni d'Italia, tra cui la Sardegna (Cacciò et al., 2003), e sono noti numerosi episodi di contaminazione delle acque ad uso ricreativo quali le piscine (Yoder et al., 2008; Plutzer et al., 2010).

Anche il monitoraggio delle sarcosporidiosi risulta di estrema importanza in quanto possono essere utilizzate come *marker* di contaminazione ambientale e di un corretto management aziendale. In particolare la presenza delle sarcosporidiosi macroscopiche (*S. gigantea* e *S. medusiformis*) indica uno stretto contatto tra gli ovini e i gatti, i quali fungono da ospiti definitivi anche per la più importante zoonosi protozoaria di origine alimentare, la toxoplasmosi, che presenta un ciclo biologico sovrapponibile. Il monitoraggio delle sarcosporidiosi macroscopiche al mattatoio potrebbe rappresentare un indicatore di rischio di toxoplasmosi in allevamento e quindi nei prodotti

di origine animale, tenuto anche conto che la diagnosi di toxoplasmosi nelle carni è possibile solamente mediante le metodiche istologiche, immunologiche o biomolecolari (PCR), mentre le sarcosporidiosi sono visibili macroscopicamente durante la visita ispettiva.

Allo stesso modo le forme microscopiche, che abbiamo visto essere molto diffuse tra gli ovini della Sardegna (basti pensare al 95,5% di prevalenza riscontrato per *S. tenella*), e che hanno come ospite definitivo il cane, indicano uno stretto contatto tra gli ovini e questo carnivoro, responsabile della trasmissione di altre zoonosi particolarmente importanti, quali ad esempio l'echinococcosi e la cenurosi, entrambe endemiche in Sardegna.

In quest'ottica occorre rimarcare quindi l'importanza dello stato sanitario non solo degli ovini, ma anche di tutti gli altri animali presenti in allevamento e con i quali gli ovini e l'uomo stesso entrano in contatto. Per perseguire questo obiettivo non è sufficiente (anche se sarebbe già un importante passo avanti) il trattamento periodico con antielmintici (come suggerito dalle linee guida ESCCAP), ma sono necessari dei controlli periodici tramite tecniche di diagnostica parassitologica, al fine di accertarsi della situazione sanitaria e razionalizzare l'uso degli antiparassitari.

In conclusione i risultati del presente studio aggiornano i dati sulla presenza di queste importanti zoonosi parassitarie nel territorio della Sardegna, e rimarcano la necessità di affrontare il problema attraverso l'approccio "One Health" (la salute umana e la salute animale devono essere "una sola salute"), attraverso la sinergia delle diverse discipline, tra la medicina veterinaria e quella umana, affinché operino di concerto a livello locale, nazionale e globale, stabilendo un approccio integrato. L'obiettivo comune è la prevenzione ed il controllo delle malattie zoonosiche mantenendo al contempo l'integrità del nostro ecosistema, a beneficio di tutti gli esseri viventi presenti e futuri, e garantendo la biodiversità.

## BIBLIOGRAFIA

- Abeywardena H, Jex AR, Gasser RB. (2015) Chapter Six-A Perspective on *Cryptosporidium* and *Giardia*, with an Emphasis on Bovines and Recent Epidemiological Findings. *Advances in Parasitology*, 88: 243–301.
- AbuBakar S, Teoh BT, Sam SS, Chang LY, Johari J, Hooi PS, Lakhbeer-Singh HK, Italiano CM, Omar SF, Wong KT, Ramli N, Tan CT. (2013) Outbreak of human infection with *Sarcocystis nesbitti*, Malaysia, 2012. *Emerg Infect Dis* 19:1989–1991.
- Acres SD, Isaacson RE, Babuik LA, Kapitany RA. (1979) Immunization of calves against enterotoxigenic colibacillosis by vaccinating dams with purified K99 antigen and whole cell bacterins. *Infection and Immunity*, 25: 121–126.
- Adam RD (2001) Biology of *Giardia lamblia*. *Clin Microbiol Rev*, 14: 447–75.
- Adam RD (1991) The biology of *Giardia* spp. *Microbiol Rev*, 55: 706–732.
- Al-Hyali N S, Aljawady MA, Mohammad-Fakhri MA. (2010) The influence of some physio-chemical properties of sarcotoxin in rats. *J Anim Vet Adv*, 9: 302–305.
- Al-Tae AF, Al-Hyali NS. (2010) Toxicity of *Sarcocystis gigantea* detected from sheep in Nineveh governorate. *Iraqi J Vet Sci*, 21: 224–243.
- Almeida A, Delgado ML, Soares SC, Castro AO, Moreira MJ, Mendonca CM, Canada NB, Da Costa JM. (2006) Genotype analysis of *Giardia* isolated from asymptomatic children in northern Portugal. *J Eukaryot Microbiol*, 53: 177–178.
- Almeida A, Moreira MJ, Soares S, Delgado ML, Figueiredo J, Silva E, Castro A, Cosa JM. (2010) Presence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in drinking water samples in the north of Portugal. *Korean J Parasitol*, 48: 43–48.

Aloisio F, Filippini G, Antenucci P, Lepri E, Pezzotti G, Cacciò SM, Pozio E. (2006) Severe weight loss in lambs infected with *Giardia duodenalis* Assemblage B. *Vet Parasitol*, 142: 154–158.

Anderson BC. (1985) Moist heat inactivation of *Cryptosporidium* sp. *American Journal of Public Health*, 75 (12): 1433–1434.

Anderson BC. (1989) *Cryptosporidium* spp in cattle. In: Angus, K.W., Blewett, D.A. (Eds.), *Cryptosporidiosis: Proceedings of the First International Workshop*, Morendum Research Institute, Edinburgh, Scotland, September 8-9, 1988, pp. 55–63.

Arness MK, Brown JD, Dubey JP, Neafie RC, Granstrom DE. (1999) An outbreak of acute eosinophilic myositis attributed to human *Sarcocystis* parasitism. *Am J Trop Med Hyg*, 61: 548–553.

Arsenopoulos K, Theodoridis A, Papadopoulos E. (2017) Effect of colostrum quantity and quality on neonatal calf diarrhoea due to *Cryptosporidium* spp. infection. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 53: 50–55.

Bahari P, Salehi M, Seyedabadi M, Mohammadi A. (2014) Molecular identification of macroscopic and microscopic cysts of *Sarcocystis* in sheep in North Khorasan Province, Iran. *Int J Mol Cell Med Winter*, 3: 51–56.

Baldursson S, Karanis P. (2011) Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks – an update 2004-2010. *Water Research*, 45: 6603–6614.

Beaver PC, Gadgil RK, Morera P. (1979) *Sarcocystis* in man: a review and report of five cases. *Am J Trop Med Hyg*, 28: 819–844.

Berkman DS, Lescano AG, Gilman RH, Lopez SL, Black MM. (2002) Effects of stunting, diarrhoeal disease, and parasitic infection during infancy on cognition in late childhood: A follow-up study. *Lancet*, 16: 564–571



- Beyazit A, Yazicioğlu Ö, Karaer Z. (2007) The prevalence of ovine *Sarcocystis* species in Izmir province. *Ank Univ Vet Fak Derg*, 54: 111–116.
- Blasi MF, Carere M, Pompa MG, Rizzuto E, Funari E. (2008) Water-related diseases outbreaks reported in Italy. *J. Wat. Health*, 6: 423–432.
- Boch J, Supperer R. (1980) *Parassitologia Clinica Veterinaria*. Essegivi, Piacenza.
- Bouزيد M, Hunter PR, Chalmers RM, Tyler KM. (2013) *Cryptosporidium* pathogenicity and virulence. *Clinical Microbiology Reviews*, 26 (1). 115–134.
- Briancesco R, Bonadonna L. (2005) An Italian study on *Cryptosporidium* and *Giardia* in wastewater, fresh water and treated water. *Environ Monit Assess*, 104: 445–57.
- Bunyaratvej S, Bunyawongwiro P, Nityanant P. (1982) Human intestinal sarcosporidiosis: report of six cases. *Am J Trop Med Hyg*, 31: 36–41.
- Cacciò SM, De Giacomo M, Aulicino FA, Pozio E. (2003) *Giardia* cysts in wastewater treatment plants in Italy. *Appl Environ Microbiol*, 69: 3393–8.
- Cacciò SM. (2005) Molecular epidemiology of human cryptosporidiosis. *Parassitologia*, 47: 185–192.
- Cacciò SM, Thompson RCA, McLauchlin J, Smith HV. (2005) Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends in Parasitology*, 21 (9): 430–437.
- Cacciò SM, Sannella AR, Mariano V, Valentini S, Berti F, Tosini F, Pozio E. (2013) A rare *Cryptosporidium parvum* genotype associated with infection of lambs and zoonotic transmission in Italy. *Veterinary Parasitology*, 191: 128–131.
- Cardona GA, de Lucio A, Bailo B, Cano L, de Fuentes I, Carmena D. (2015) Unexpected finding of feline-specific *Giardia duodenalis* assemblage F and *Cryptosporidium felis* in asymptomatic adult cattle in Northern Spain. *Veterinary Parasitology*, 209 (3): 258–263.

- Casarosa L. (1985) *Parassitologia degli animali domestici III*. Ed. Casa Editrice Ambrosiana Milano,
- Casemore DP, Wright SE, Coop RL. (1997) Cryptosporidiosis human and animal epidemiology. In: *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. Fayer (Ed.). Boca Ratón, Florida. CRC Press, pp: 65–92.
- Castro-Hermida JA, Carro-Corral C, González-Warleta M, Mezo M. (2006) Prevalence and intensity of infection of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in dairy cattle in Galicia (NW Spain). *Journal of Veterinary Medicine. Series B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, 53: 244–246.
- Castro-Hermida JA, García-Preedo I, Almeida A, González-Warleta M, Correia Da Costa JM, Mezo M. (2008) Presence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* through drinking water. *Sci Total Environ*, 405: 45–53.
- Castro-Hermida JA, García-Preedo I, Almeida A, González-Warleta M, Da Costa JM, Mezo M. (2009) Detection of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in surface water: a health risk for humans and animals. *Wat Res*, 43: 4133–4142.
- Cavalier-Smith T. (2003) Protist phylogeny and the high-level classification of Protozoa. *European J Protist*, 39: 338–348.
- CDC. (1994) Recommendations and Reports. Addressing Emerging Infectious Disease Threats: A Prevention Strategy for the United States. *MMWR*. 43 / No. RR-5
- Certad G, Ngouanesavanh T, Guyot K, Gantois N, Chassat T, Mouray A, Fleurisse L, Pinon A, Cailliez JC, Dei-Cas E, Creusy C. (2007) *Cryptosporidium parvum*, a potential cause of colic adenocarcinoma. *Infectious Agents and Cancer*, 2 (1): 22.
- Chalmers RM, Davies AP. (2010) Minireview: clinical cryptosporidiosis. *Experimental Parasitology*, 124 (1): 138–146.

Chalmers RM, Katzer F. (2013) Looking for *Cryptosporidium*: the application of advances in detection and diagnosis. *Trends of Parasitology*, 29: 237–251.

Chalmers RM, Elwin K, Thomas AL, Guy EC, Mason B. (2009) Long-term *Cryptosporidium* typing reveals the aetiology and species-specific epidemiology of human cryptosporidiosis in England and Wales, 2000 to 2003. *Euro Surveill*, 14: 19086.

Chappell CL, Okhuysen PC, Langer-Curry R, Widmer G, Akiyoshi DE, Tanriverdi S, Tzipori S. (2006) *Cryptosporidium hominis*: experimental challenge of healthy adults. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 75: 851–857.

Chappell CL, Okhuysen PC, Langer-Curry RC, Akiyoshi DE, Widmer G, Tzipori S. (2011) *Cryptosporidium meleagridis*: infectivity in healthy adult volunteers. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 85: 238–242.

Chessa G, Chisu V, Porcu R, Masala G. (2014) Molecular characterization of *Toxoplasma gondii* Type II in sheep abortion in Sardinia, Italy. *Parasite*, 21: 6.

Clavel A, Doiz O, Varea M, Morales S, Castillo FJ, Rubio MC, Gómez-Lus R. (2001) Abdominal discomfort and soft stools in a habitual consumer of rare beef. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 19: 29–30.

Cook N, Nichols RA, Wilkinson N, Paton CA, Barker K, Smith HV. (2007) Development of a method for detection of *Giardia duodenalis* cysts on lettuce and for simultaneous analysis of salad products for the presence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts. *Appl Environ Microbiol*, 73: 7388–7391.

Cordero del Campillo M, Rojo Vázquez FA. (1999) *Parasitologia Veterinaria*, pp: 620–623.

Costa JFDR, Novo SMF, Baccili CC, Sobreira NM, Hurley DJ, Gomes V. (2017) Innate immune response in neonate Holstein heifer calves fed fresh or frozen colostrum. *Research in Veterinary Science*, 115: 54–60.

- Coupe S, Delabre K, Pouillot R, Houdart S, Santillana-Hayat M, Derouin F. (2006) Detection of *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Enterocytozoon bieneusi* in surface water, including recreational areas: a one-year prospective study. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 47: 351–359.
- Crotti D, D'Annibale ML, Fonzo G, Lalle M, Cacciò SM, Pozio E. (2005) *Dientamoeba fragilis* is more prevalent than *Giardia duodenalis* in children and adults attending a day care centre in Central Italy. *Parasite*, 12: 165–70.
- Current WL, Leech JH, Sande MA, Root RK. (1988) The biology of *Cryptosporidium*. *Parasitic infections*, 109–132.
- Current WL, Garcia L (1991) Cryptosporidiosis. *Clin Microbiol Rev*, 325–358.
- Current WL, Reese NC. (1986) A comparison of endogenous development of three isolates of *Cryptosporidium* in suckling mice. *The Journal of Protozoology*, 33: 98–108.
- Current WL. (1985) Cryptosporidiosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 187(12): 1334–8.
- Da Silva AJ, Cacciò S, Williams C, Won KY, Nace EK, Whittier C. (2003) Molecular and morphologic characterization of a *Cryptosporidium* genotype identified in lemurs. *Veterinary Parasitology*, 111: 297–307.
- De Carneri (2004) *Parassitologia generale e umana*, Casa Editrice Ambrosiana.
- De Graaf DC, Vanopdenbosch E, Ortega-Mora LM, Abbassi H, Peeters JE. (1999) A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. *Int J Parasitol*, 29: 1269–1287.
- Deluol AM, Mechali D, Cenac J, Savel J, Coulaud JP. (1980) Incidence and clinical aspects of intestinal coccidiosis in a tropical medicine practice. *Bull Soc Pathol Exot Filiales*, 73: 259–265.
- Denkinger CM, Harigopal P, Ruiz P, Dowdy LM. (2008) *Cryptosporidium parvum*-associated sclerosing cholangitis in a liver transplant patient. *Transpl Infect Dis*, 10(2): 133–136.

Díaz P, Quílez J, Chalmers RM, Panadero R, López C, Sánchez-Acedo C, Morrondo P, Díez-Baños P. (2010) Genotype and subtype analysis of *Cryptosporidium* isolates from calves and lambs in Galicia (NW Spain). *Parasitology*, 137(8): 1187–1193.

Díaz P, Pipia AP, Varcasia A, Sanna G, Ruiu A, Spissu P, Díez-Baños P, Morrondo P, Scala A. (2010b) Prevalence and risk factors of *Cryptosporidium* spp infection in cattle farms in Sardinia (Italy). XXVI Congresso Nazionale Società Italiana di Parassitologia. Perugia (Italia), 22-25 Giugno 2010.

Díaz P, Soilán M, Navarro E, Pérez A, Cabanelas E, Prieto A, Díaz J, López CM, Panadero R, Fernández G, Morrondo P, Díez-Baños P. (2014) Criptosporidiosis en rumiantes. *Ganadería*, 94: 44–48.

Díaz P, Quílez J, Prieto A, Navarro E, Pérez-Creo A, Fernández G, Panadero R, López CM, Díez-Baños P, Morrondo P. (2015) *Cryptosporidium* species and subtype analysis in diarrhoeic pre-weaned lambs and goat kids from north-western Spain. *Parasitology Research*, 114 (11): 4099–4105.

Díez-Baños P. (1978) Sobre la prevalencia de la Sarcosporidiosis ovina en la provincia de Leon, con un estudio comparative de diversosmetode diagnosticos. *An Fac Vet Leon*, 24: 195–199.

Dubey JP, Lindsay DS. (2006) Neosporosis, Toxoplasmosis, and Sarcocystosis in Ruminants *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 22 (3): 645–671.

Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA, Fayer R, Livingstone Jr CW. (1988) *Sarcocystis arieticanis* and other *Sarcocystis* species in sheep in the United States. *J Parasitol*, 74: 1033–1038.

Dubey JP, Speer CA, Fayer R. (1989) *Sarcocystosis of animals and man*. CRC Press, Boca Raton, FL.

DuPont HL, Chappell CL, Sterling CR, Okhuysen PC, Rose JB, Jakubowski W. (1995) The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. *New England Journal of Medicine*, 332 (13): 855–859.

Dunlap BG, Thies ML. (2002) *Giardia* in beaver (*Castor canadensis*) and nutria (*Myocastor coypus*) from east Texas. *J Parasitol*, 88: 1254–1258.

Elwin K, Hadfield SJ, Robinson G, Chalmers RM. (2012) The epidemiology of sporadic human infections with unusual cryptosporidia detected during routine typing in England and Wales, 2000–2008. *Epidemiology and Infection*, 140: 673–683.

Elwin K, Chalmers RM. (2008) Contemporary identification of previously reported novel *Cryptosporidium* isolates reveals *Cryptosporidium bovis* and the cervine genotype in sheep (*Ovis aries*). *Parasitology Research*, 102: 1103–1105.

Esposito DH, Stich A, Epelboin L, Malvy D, Han PV, Bottieau E, da Silva A, Zanger P, Slesak G, van Genderen PJJ, Rosenthal BM, Camer JP, Visser LG, Munoz J, Drew CP, Goldsmith CS, Steiner F, Wagner N, Grobusch MP, Plier DA, Tappe , Sotir MJ, Brown C, Brunette GW, Fayer R, von Sonnenburg F, Freedman D, Neumayr A, Kozarsky PE. (2014) Acute muscular sarcocystosis: an international investigation among ill travelers returning from Tioman Island, Malaysia, 2011 and 2012. *Clin Infect Dis*, 59: 1401–1410.

Essid R, Mousli M, Aoun K, Abdelmalek R, Mellouli F, Kanoun F, Derouin F, Bouratbine A. (2008) Identification of *Cryptosporidium* species infecting humans in Tunisia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 79 (5): 702–705.

Ey PL, Mansouri M, Kulda J, Nohynkova E, Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G. (1997) Genetic analysis of *Giardia* from hooved farm animals reveals artiodactyl-specific and potentially zoonotic genotypes. *J Eukaryot Microbiol*, 44: 626–635.

Fayer R, Santín M, Macarisin D. (2010) *Cryptosporidium ubiquitum* n. sp. in animals and humans. *Veterinary Parasitology*, 172: 23–32.

Fayer R. (2008) General Biology. In: Fayer R, Xiao L, editors. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. CRC Press; Boca Raton, 1–42.

- Fayer R, Santín M, Trout JM. (2008) *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *Veterinary Parasitology*, 156: 191–198.
- Fayer R. (1976) Economic losses to sarcocystosis. *Natl Wool Grow*, 66: 22–28.
- Fayer R. (2004) *Sarcocystis* spp. in human infections. *Clin Microbiol Rev*, 17: 894–902.
- Fayer R. (1977) Production of *Sarcocystis cruzi* sporocysts by dogs fed experimentally infected and naturally infected beef. *J Parasitol*, 63: 1072–1075.
- Fayer R, Dubey JP. (1988) *Sarcocystis* induced abortion and fetal death. *Prog Clin Biol Res*, 281: 153–164.
- Fayer R, Esposito DH, Dubey JP. (2015) Human infections with *Sarcocystis* species. *Clin Microbiol Rev*. 28(2): 295–311.
- Fayer R, Morgan U, Upton SJ. (2000) Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *International Journal for Parasitology*, 30: 1305–1322.
- Fayer R, Trout JM, Jenkins MC. (1998) Infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts stored in water at environmental temperatures. *Journal of Parasitology*, 84 (6): 1165–1169.
- Fayer R, Ungar BL. (1986) *Cryptosporidium* spp. and cryptosporidiosis. *Microbiol Rev*, 50(4): 458–483.
- Fayer R, Santín M, Trout JM, DeStefano S, Koenen K, Kaur T. (2006) Prevalence of Microsporidia, *Cryptosporidium* spp., and *Giardia* spp. in beavers (*Castor canadensis*) in Massachusetts. *J Zoo Wildl Med*, 37: 492–497.
- Feng Y, Alderisio KA, Yang W, Blancero LA, Kuhne WG, Ndareski CA. (2007) *Cryptosporidium* genotypes in wildlife from a New York watershed. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 6475–83.

- Feng Y, Xiao L. (2011) Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clin Microbiol Rev*, 24(1): 110–40.
- Filice FP. (1952) Studies on the cytology and life history of a *Giardia* from the laboratory rat. *Univ California Publ Zool*, 57: 53–146.
- Flentje B, Jungmann R, Hiepe T. (1975) Vorkommen von *Isospora-hominis* Sporozysten beim Menschen. *Dtsch Gesundheitsw*, 30: 523–525.
- Fletcher SM, Stark D, Harkness J, Ellis J. (2012) Enteric protozoa in the developed world: a public health perspective. *Clin Microbiol Rev*, 25: 420–449.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization (FAO/WHO). (2014) Multicriteria-based ranking for risk management of food-borne parasites. *Microbiological Risk Assessment Series No. 23*. Rome: FAO/WHO. Available from: <http://www.fao.org/3/a-i3649e.pdf>.
- Freire-Santos F, Oteiza-Lopez AM, Vergara-Castilblanco CA, Ares-Mazas ME, Alvarez-Suarez E, Garcia-Martin O. (2000) Detection of *Cryptosporidium* oocysts in bivalve molluscs destined for human consumption. *J Parasitol*, 86(4): 853–854.
- Frost F, Muller T. (1999) Two city *Cryptosporidium* study. American Water Works Association Research Foundation, Denver, Colorado.
- Fujino T, Matsui T, Kobayashi F, Haruki K, Yoshino Y, Kajima J, Tsuji M. (2002) The effect of heating against *Cryptosporidium* oocysts. *Journal of Veterinary Medical Science/ the Japanese Society of Veterinary Science*, 64 (3): 199–200.
- Fukuyo M, Battsetseg G, Byamba B. (2002) Prevalence of *Sarcocystis* infection in meatproducing animals in Mongolia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 33: 490–495.



García-Meniño I, Díaz P, Gómez V, Prieto A, Fernández G, Díez-Baños P, Morrondo P, Mora A. (2015) Estudio de prevalencia de enteropatógenos implicados en la diarrea del ternero en Galicia. El Boletín de ANEMBE, 108: 33–37.

García-Sánchez E, Valladares-Carranza B, Talavera-Rojas M, Velázquez-Ordóñez V. (2014) Cryptosporidiosis. Importancia en salud pública. REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria [online], 15 (5).

Gelletlie R, Stuart J, Soltanpoor N, Armstrong R, Nichols G. (1997) Cryptosporidiosis associated with school milk. The Lancet, 350(9083): 1005–1006.

Gelsing SL, Heinrichs AJ. (2017) Comparison of immune responses in calves fed heat-treated or unheated colostrum. Journal of Dairy Science, 100 (5): 4090–4101.

Genchi C. (2001) Criptosporidiosi: aggiornamento e prospettive di controllo. Monografia Settembre 2001.

Gentile G, Venditti M, Micozzi A, Caprioli A, Donelli G, Tirindelli C, Meloni G, Arcese W, Martino P. (1991) Cryptosporidiosis in patients with hematologic malignancies. Rev Infect Dis. Sep-Oct, 13(5): 842–846.

Giangaspero A, Molini U, Iorio R, Traversa D, Paoletti B, Giansante C. (2005) Detection of *Cryptosporidium parvum* (genotype 2) oocysts in seawater clams (*Chamelea gallina*) in Italy. Prev Vet Med, 69: 203–212.

Giangaspero A, Paoletti B, Iorio R, Traversa D. (2005) Prevalence and molecular characterization of *Giardia duodenalis* from sheep in central Italy. Parasitol Res, 96: 32–7.

Giannetto S, Poglayen G, Brianti E, Gaglio G, Scala A. (2005) *Sarcocystis gracilis*-like sarcocysts in a sheep. Vet Rec, 156: 322–323.

Giboda M, Rakár J. (1978) First record of “*Isospora hominis*” in Czechoslovakia. Folia Parasitol (Praha), 25: 16.

Gjerde B. (2013) Phylogenetic relationships among *Sarcocystis* species in cervids, cattle, and sheep inferred from the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I gene. *Int J Parasitol*, 43: 579–591.

Glaberman S, Sulaiman IM, Bern C, Limor J, Peng MM, Morgan U, Gilman R, Lal AA, Xiao L. (2001) A multilocus genotypic analysis of *Cryptosporidium meleagridis*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 48 (Suppl 1): 19S–22S.

Gomez-Couso H, Freire-Santos F, Martinez-Urtaza J, Garcia-Martin O, Ares-Mazas ME (2003). Contamination of bivalve molluscs by *Cryptosporidium* oocysts: the need for new quality control standards. *Int J F Micr*, 87: 97–105.

Goodgame R. (2003) Emerging causes of traveler's diarrhea: *Cryptosporidium*, *Cyclospora*, *Isospora*, and Microsporidia. *Current Infectious Disease Reports*, 5 (1): 66–73.

Graczyk TK, Fayer R, Knight R, Mhangami-Ruwende B, Trout JM, Da Silva AJ, Pieniazek NJ. (2000) Mechanical transport and transmission of *Cryptosporidium parvum* oocysts by wild filth flies. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 63 (3-4): 178–183.

Graczyk TK, Conn DB, Marcogliese DJ, Graczyk H, De Lafontaine Y. (2003) Accumulation of human waterborne parasites by zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) and Asian freshwater clams (*Corbicula fluminea*). *Parasitol Res*, 89: 107–112.

Harper CM, Cowell NA, Adams BC, Langley AJ, Wohlsen TD. (2002) Outbreak of *Cryptosporidium* linked to drinking unpasteurised milk. *Commun Dis Intell Q Rep*, 26(3): 449–450.

Heckerth AR, Tenter AM. (1999) Development and validation of species-specific nested PCRs for diagnosis of acute sarcocystosis in sheep. *Int J Parasitol*, 29: 1331–1349.

Heydorn AO, Rommel M. (1972) Beitrage zum Lebenszyklus der Sarkosporidien. II. Hund und Katze als Ubertrager ser Sarkosporidien des Rindes. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 85: 121–123.

- Homan WL. (1992) Comparison of *Giardia* isolates from different laboratories by isoenzyme analysis and recombinant DNA probes. *Parasitol Res*, 78: 316–323.
- Huamanchay O, Genzlinger L, Iglesias M, Ortega YR. (2004) Ingestion of *Cryptosporidium* oocysts by *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Parasitology*, 90 (5): 1176–1178.
- Huetink RE, Van der Giessen JW, Noordhuizen JP, Ploeger HW. (2001) Epidemiology of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* on a dairy farm. *Veterinary Parasitology*, 102: 53–67.
- Hunter PR, Hughes S, Woodhouse S, Raj N, Syed Q, Chalmers RM, Verlander NQ, Goodacre J. (2004) Health sequelae of human cryptosporidiosis in immunocompetent patients. *Clinical Infectious Diseases*, 39 (4): 504–510.
- Husna Maizura AM, Khebir V, Chong CK, Shah A, Hakim L. (2012) Surveillance for sarcocystosis in Tioman Island, Malaysia. *Malaysian J Public Health Med*, 12: 39–44.
- Italiano CM, Wong KT, AbuBakar S, Lau YL, Ramli N, Syed Omar SF, Kahar Bador M, Tan CT. (2014) *Sarcocystis nesbitti* causes acute relapsing febrile myositis with a high attack rate: description of a large outbreak of muscular sarcocystosis in Pangkor Island, Malaysia, 2012. *PLoS Negl Trop Dis*, 8: e2876.
- Jaggi N, Rajeshwari S, Mittal SK, Mathur MD, Baveja UK. (1994) Assessment of the immune and nutritional status of the host in childhood diarrhoea due to *Cryptosporidium*. *J Commun Dis*, 26: 181–5.
- Janitschke K. (1974) Coccidia infections in man in Germany, p 116 In Proceedings of the 3rd International Congress of Parasitology, Munich, August 25-31, 1974. Facta Publication, Munich, Germany.
- Janitschke K. (1975) Neue Erkenntnisse über die Kokzidien-infektionen des Menschen. II. Isospora Infektion. *Bundesgesundheitsblatt*, 18: 419.

- Jellison KL, Lynch AE, Ziemann JM. (2009) Source tracking identifies deer and geese as vectors of human-infectious *Cryptosporidium* genotypes in an urban/suburban watershed. *Environmental Science and Technology*, 43: 4267–4272.
- Jiang J, Alderisio KA, Xiao L. (2005) Distribution of *Cryptosporidium* genotypes in storm event water samples from three watersheds in New York. *Applied Environmental Microbiology*, 71: 4446–4454.
- Kamata Y, Saito M, Irikura D, Yahata Y, Ohnishi T, Bessho T, Inui T, Watanabe M, Sugita-Konishi Y. (2014) A toxin isolated from *Sarcocystis fayeri* in raw horsemeat may be responsible for food poisoning. *J Food Prot*, 77: 814–819.
- Karanis P, Ey P. (1998) Characterization of axenic isolates of *Giardia intestinalis* established from humans and animals in Germany. *Parasitol Res*, 84: 442–449.
- Karanis P, Maier WA, Schoenen D, Seitz HM. (1992) UV sensitivity of protozoan parasites. *J Wat Supply Res Technol AQUA*, 41: 95–100.
- Karanis P, Kourenti C, Smith H. (2007) Water-borne transmission of protozoan parasites: a review of world-wide outbreaks and lessons learnt. *J Wat Health*, 5: 1–38.
- Kelly D, Coutts AGP. (2000) Early nutrition and the development of immune function in the neonate. *Proceedings of the Nutrition Society*, 59: 177–185.
- Khalifa AM, El Tamsahy MM, Abou El Naga IF. (2001) Effect of ozone on the viability of some protozoa in drinking water. *J Egypt Soc Parasitol*, 31: 603–616.
- Kibbler CC, Smith A, Hamilton-Dutoit SJ, Milburn H, Pattinson JK, Prentice HG. (1987) Pulmonary cryptosporidiosis occurring in a bone marrow transplant patient. *Scand J Infect Dis*, 19: 581–584.
- Laarman JJ. (1962) *Isospora hominis* (Railliet and Lucet, 1891) in the Netherlands. *Acta Leiden*, 31: 111–116.

Laberge I, Griffiths MW, Griffiths MW. (1996) Prevalence, detection and control of *Cryptosporidium parvum* in food. *International Journal of Food Microbiology*, 32 (1): 1–26.

Lalle M, Pozio E, Capelli G, Bruschi F, Crotti D, Cacciò SM. (2005) Genetic heterogeneity at the beta-giardin locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. *Int J Parasitol*, 35: 207–13.

Latif B, Al-Delemi J, Mohammed B, Al-Bayati S, Al-Amiry A. (1999) Prevalence of *Sarcocystis* spp. in meat producing animals in Iraq. *Vet Parasitol*, 84: 599–608.

Lau YL, Chang PY, Tan CT, Fong MY, Mahmud R, Wong KT. (2014) *Sarcocystis nesbitti* infection in human skeletal muscle: possible transmission from snakes. *Am J Trop Med Hyg*, 90: 361–364.

Leek RG, Fayer R. (1978) Sheep experimentally infected with *Sarcocystis* from dogs. II. Abortion and disease in ewes. *Cornell Vet*, 68: 108–123;

Leoni A, Scala A, Garippa G, Pirino S, Sanna P. (1995) La sarcosporidiosi del cinghiale (*Sus scrofa meridionalis*) in Sardegna: aspetti epidemiologici, morfo - ultrastrutturali e anatomo - istopatologici. *Convegno Nazionale Problematiche Veterinarie emergenti nelle aree protette*, Teramo. 17-22

Li Y, Lian Z. (1986) Study on man–pig cyclic infection of *Sarcocystis suihominis* found in Yunnan Province, China (In Chinese). *Acta Zool Sin*, 32: 329–335.

Li JH, Lin Z, Tan YX, Du JF. (2004) *Sarcocystis suihominis* infection discovered in Guangxi. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi*, 22: 82.

Li JH, Lin Z, Du JF, Qin YX. (2007) Experimental infection of *Sarcocystis suihominis* in pig and human volunteer in Guangxi. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi*, 25: 466–468.

- Li N, Xiao L, Alderisio K, Elwin K, Cebelinski E, Chalmers R, Santin M, Fayer R, Kvac M, Ryan U, Sak B, Stanko M, Guo Y, Wang L, Zhang L, Cai J, Roelli D, Feng Y. (2014) Subtyping *Cryptosporidium ubiquitum*, a zoonotic pathogen emerging in humans. *Emerging Infectious Diseases*, 20 (2): 217–224.
- Linden KG, Shin GA, Faubert G, Cairns W, Sobsey MD. (2002) UV disinfection of *Giardia lamblia* cysts in water. *Environ Sci Technol*, 36: 2519–2522.
- Llorente MT, Clavel A, Goni MP, Varea M, Seral C, Becerril R, Suarez L, Gómez-Lus R. (2007) Genetic characterization of *Cryptosporidium* species from humans in Spain. *Parasitology International*, 56: 201–205.
- Lobo ML, Xiao L, Antunes F, Matos O. (2009) Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* genotypes and subtypes in raw and treated water in Portugal. *Lett Appl Microbiol*, 48: 732–737.
- Long SM, Adak GK, O’Brien SJ, Gillespie IA. (2002). General outbreaks of infectious intestinal disease linked with salad vegetables and fruit, England and Wales, 1992-2000. *Commun Dis Public Health*, 5(2): 101–105.
- Lundborg GK, Svensson EC, Oltenacu PA. (2005) Herd-level risk factors for infectious diseases in Swedish dairy calves aged 0–90 days. *Preventive Veterinary Medicine*, 68 (2): 123–143.
- Ma P, Soave R. (1983) Three-step stool examination for cryptosporidiosis in 10 homosexual men with protracted watery diarrhea. *Journal of Infectious Diseases*, 147: 824–828.
- Macpherson CNL, Gottstein B, Geerts S. (2000) Parasitic food-borne and water-borne zoonoses *OIE Revue Scientifique et Technique*, 12 (1): 240–258.
- Machado ECL, Stamford TLM, Alves LC, Melo RG, Shinohara NKS. (2006) Effectiveness of *Cryptosporidium* spp. oocysts detection and enumeration methods in water and milk samples. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*, 58 (3): 432–439.

- MacKenzie WR, Hoxie NJ, Proctor ME, Gradus MS, Blair KA, Peterson DE. (1994) A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *N Eng J Med*, 331: 161–7.
- Maddox-Hyttel C, Langkjaer RB, Enemark HL, Vigre H. (2006) *Cryptosporidium* and *Giardia* in different age groups of Danish cattle and pigs-occurrence and management associated risk factors. *Veterinary Parasitology*, 141: 48–59.
- Mahdi NK, Ali NH. (2002) Cryptosporidiosis among animal handlers and their livestock in Basrah, Iraq. *East African Medical Journal*, 79 (10): 550–553.
- Majewska AC, Graczyk TK, Słodkiewicz-Kowalska A, Tamang L, Jedrzejewski S, Zduniak P, Solarczyk P, Nowosad A, Nowosad P. (2009) The role of free-ranging, captive, and domestic birds of Western Poland in environmental contamination with *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Giardia lamblia* cysts. *Parasitol Res*, 104: 1093–1099.
- Mala P, Baranova M. (1995) Diagnosis of *Sarcocystis* infection in slaughter animals at veterinary meat inspection. *Vet Med*, 40: 97–100.
- Mariano V, Nardi A. (2014) Cryptosporidiosis in neonatal lambs diarrhoea. *Large animal review*, 20(6): 259–263.
- Masala G, Porcu R, Daga C, Denti S, Canu G, Patta C, Tola S. (2007). Detection of pathogens in ovine and caprine abortion samples from Sardinia, Italy, by PCR. *J Vet Diagn Invest*, 19: 96–98.
- Masala G, Porcu R, Madau L, Tanda A, Ibba B, Satta G, Tola S. (2003) Survey of ovine and caprine toxoplasmosis by IFAT and PCR assays in Sardinia, Italy. *Vet Parasitol*, 117(1–2): 15–21.
- Mayrhofer G. (1995) Division of *Giardia* isolates from humans into two genetically distinct assemblages by electrophoretic analysis of enzymes encoded at 27 loci and comparison with *Giardia muris*. *Parasitology*, 111: 11–17.

- McCluskey BJ, Greiner EC, Donovan GA. (1995) Patterns of *Cryptosporidium* oocyst shedding in calves and a comparison of two diagnostic methods. *Vet Parasitol*, 60: 185–190.
- McRoberts KM, Meloni BP, Morgan UM, Marano R, Binz N, Eriandson SL, Halse SA, Thompson RC. (1996) Morphological and molecular characterization of *Giardia* isolated from the straw-necked ibis (*Threskiornis spinicollis*) in Western Australia. *J. Parasitol*, 82: 711–718.
- Medema G, Teunis P, Blokker M, Deere D, Davison A, Charles P, Loret JF. (2006) WHO Guidelines for Drinking Water Quality: *Cryptosporidium*. WHO, New York, 138.
- Mehlhorn H, Heydorn AO, Gestrich R. (1975) Licht und elektronenmikroskopische Untersuchungen an Cysten von *Sarcocystis ovis* Heydorn et al. (1975) in der Musculatur von Schafen. *Z. Parasitenkd*, 48: 83–93.
- Meinhardt PL, Casemore DP, Miller KB. (1996) Epidemiological aspects of human cryptosporidiosis and the role of waterborne transmission. *Epidemiol Rev*, 18: 118–36.
- Meisel JL, Perera DR, Meligro C, Rubin CE. (1976) Overwhelming watery diarrhea associated with a cryptosporidium in an immunosuppressed patient. *Gastroenterology*, 70: 1156–1160.
- Meloni BP, Thompson RC. (1987) Comparative studies on the axenic in vitro cultivation of *Giardia* of human and canine origin: evidence for intraspecific variation. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 81: 637–640.
- Méndez-Hermida F, Gómez-Couso H, Romero-Suances R, Ares-Mazás E. (2007) *Cryptosporidium* and *Giardia* in wild otters (*Lutra lutra*). *Vet. Parasitol*, 144: 153–156.
- Miescher F. (1843) Über eigenthümliche Schließfluche in den Muskeln einer Hausmaus. *Ber vert naturforsch ges basel*. 5: 198–202.
- Mirzaei Dehaghi M, Rezaei H. (2014) The role of sheep in the epidemiology of *Sarcocystis* spp. in Tabriz area northwest of Iran. *J Parasit Dis*, <http://dx.doi.org/10.1007/s12639-014-0495-6>.



- Mirzaei Dehaghi M, Fallahi M, Sami M, Radfar MH. (2013) Survey of *Sarcocystis* infection in slaughtered sheep in Kerman Abattoir, Kerman, Iran. *Comp Clin Pathol*, 22: 343–346.
- Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G, Mackrill J, Kulda J, Isaac-Renton JL, Ey PL. (1998) Novel lineages of *Giardia intestinalis* identified by genetic analysis of organisms isolated from dogs in Australia. *Parasitology*, 116: 17–19.
- Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G, Ey PL. (1999) Molecular systematics of the parasitic protozoan *Giardia intestinalis*. *Mol Biol Evol*, 16: 1135–1144.
- Monis PT, Thompson RC. (2003) Cryptosporidium and Giardia zoonoses: fact or fiction?. *Inf Gen Evoln*, 3: 233–244.
- Mons C, Dumètre A, Gosselin S, Galliot C, Moulin L. (2009) Monitoring of *Cryptosporidium* and *Giardia* river contamination in Paris area. *Wat Res*, 43: 211–217.
- Moon HW, McClurkin AW, Isaacson RE, Pohlenz J, Skartvedt SM, Gillette K G, Baetz AL. (1978) Pathogenic relationships of rotavirus, *Escherichia coli*, and other agents in mixed infections in calves. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 173 (5 Pt 2): 577–583.
- Morgan UM, Xiao L, Fayer R, Lal AA, Thompson RC. (1999) Variation in *Cryptosporidium*: towards a taxonomic revision of the genus. *International Journal for Parasitology*, 29: 1733–1751.
- Morin M, Lariviere S, Lallier R. (1976) Pathological and microbiological observations made on spontaneous cases of acute neonatal calf diarrhea. *Can J Comp Med*, 40: 228–240.
- Morrison HG, McArthur AG, Gillin FD, Aley SB, Adam RD, Olsen GJ, Best AA, Cande WZ, Chen F, Cipriano MJ, Davids BJ, Dawson SC, Elmendorf HG, Hehl AB, Holder ME, Huse SM, Kim UU, Lasek-Nesselquist E, Manning G, Nigam A, Nixon JE, Palm D, Passamanek NE, Prabhu A, Reich CI, Reiner DS, Samuelson J, Svard SG, Sogin ML. (2007) Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Science*, 317: 1921–1926.

- Mugridge NB, Morrison DA, Johnson AM, Luton K, Dubey JP, Votýpka J, Tenter AM. (1999) Phylogenetic relationships of the genus *Frenkelia*: a review of its history and new knowledge gained from comparison of large subunit ribosomal ribonucleic acid gene sequences. *Int J Parasitol*, 29: 957–972.
- Munday BL. (1979) The effect of *Sarcocystis ovis* on growth rate and haematocrit in lambs. *Vet Parasitol*, 5: 129–135.
- Munday BL. (1981) Premature parturition in ewes inoculated with *Sarcocystis ovis*. *Vet Parasitol*, 9: 17–26.
- Munday BL. (1986) Effects of different doses of dog derived *Sarcocystis* sporocysts on growth rate and haematocrit in lambs. *Vet Parasitol*, 21: 21–24.
- Nair P, Mohamed JA, DuPont HL, Figueroa JF, Carlin LG, Jiang ZD, Belkind-Gerson J, Martinez-Sandoval FG, Okhuysen PC. (2008) Epidemiology of cryptosporidiosis in north American travelers to Mexico. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 79 (2): 210–214.
- Natale A, Porqueddu M, Capelli G, Mocci G, Marras MA, Sanna Coccone GN, Garippa G, Scala A. (2006) Sero-epidemiological update on sheep toxoplasmosis in Sardinia (Italy). *Atti Toxo & Food*, Palermo, Italy, 84–85.
- Navin TR, Juranek DD. (1984) Cryptosporidiosis: clinical, epidemiologic, and parasitologic review. *Rev Infect Dis*, 6(3): 313–327.
- Neill MA, Rice SK, Ahmad NV, Flanigan TP. (1996) Cryptosporidiosis: an unrecognized cause of diarrhea in elderly hospitalized patients. *Clin Infect Dis*, 22: 168–70.
- Nichols G. (2007) Epidemiology. En: *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. Fayer, R.; Xiao, L. (Eds.). CRC Press, Boca Raton, Florida. pp: 79–118.

- Nichols RA, Connelly L, Sullivan CB, Smith HV. (2010) Identification of *Cryptosporidium* species and genotypes in Scottish raw and drinking waters during a one-year monitoring period. *Applied Environmental Microbiology*, 76: 5977–5986.
- Nime FA, Burek JD, Page DL, Holscher MA, Yardley JH. (1976) Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology*, 70: 592–598.
- Obendorf DL, Munday BL. (1987). Experimental infection with *Sarcocystis medusiformis* in sheep. *Vet Parasitol*, 24: 59–65.
- Okhuysen PC. (2001) Traveler's diarrhea due to intestinal protozoa. *Clinical Infectious Diseases*, 33 (1): 110–114.
- Okhuysen PC, Chappell CL, Sterling CR, Jakubowski W, DuPont HL. (1998) Susceptibility and serologic response of healthy adults to reinfection with *Cryptosporidium parvum*. *Infection and Immunity*, 66: 441–443.
- Olson ME, Thorlakson CL, Deselliers L, Morck DW, McAllister TA. (1997) *Giardia* and *Cryptosporidium* in Canadian farm animals. *Vet. Parasitol*, 68: 375–381.
- Olson ME, Ceri H, Morck DW. (2000) *Giardia* vaccination. *Parasitol Today*, 16: 213–217.
- Olson ME, O'Handley RM, Ralston BJ, McAllister TA, Thompson RC (2004) Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle. *Trends in Parasitology*, 20: 185–191.
- Ong CS, Eisler DL, Alikhani A, Fung VW, Tomblin J, Bowie WR, Isaac-Renton JL. (2002) Novel *Cryptosporidium* genotypes in sporadic cryptosporidiosis cases: first report of human infections with a cervine genotype. *Emerging Infectious Diseases*, 8: 263–268.
- Ongerth E, Stibbs H. (1989) Prevalence of *Cryptosporidium* infection in dairy calves in Western Washington. *Am J Vet Res*, 50(7): 1069–70.

- Ortega-Mora LM, Wright SE. (1994) Age-related resistance in bovine cryptosporidiosis: patterns of infection and humoral immune response. *Infection and Immunity*, 62: 5003–5009.
- Oryan A, Moghaddar N, Gaur SNS. (1996) The distribution pattern of *Sarcocystis* species, their transmission and pathogenesis in sheep in Fars province of Iran. *Vet Res Commun*, 20: 243–253.
- Ozmen O, Sahinduran S, Yukari BA. (2004) Comparative evaluation on clinicopathological findings and treatment in acute and chronic Coccidiosis of lambs and kids. *Indian Veterinary Journal*, 81: 1206–1209.
- O'Handley RM, Cockwill C, McAllister TA, Jelinski M, Morck DW, Olson ME. (1999) Duration of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in dairy calves and their association with diarrhea. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 214 (3): 391–396.
- O'Handley RM, Ceri H, Anette C, Olson ME. (2003) Passive immunity and serological immune response in dairy calves associates with natural *Giardia duodenalis* infections. *Vet. Parasitol*, 113: 89.
- O'Toole D. (1987) Experimental ovine sarcocystosis: sequential ultrastructural pathology in skeletal muscle. *J Comp Pathol*, 97: 51–60.
- Pathmanathan R, Kan SP. (1992) Three cases of human *Sarcocystis* infection with a review of human muscular sarcocystosis in Malaysia. *Trop Geogr Med*, 44: 102–108.
- Pedraza-Díaz S, Amar C, Nichols GL, McLauchlin J (2001) Nested Polymerase Chain Reaction for Amplification of the *Cryptosporidium* Oocyst Wall Protein Gene. *Emerg Infect Dis*, 7(1): 49–56.
- Peng MP, Xiao L, Freeman AR, Arrowood MJ, Escalante A, Weltman AC. (1997) Genetic polymorphism among *Cryptosporidium parvum* isolates supporting two distinct transmission cycles. *Emerg Infect Dis*, 3: 567–573.

- Pérez-Creo A, Panadero R, López C, Díaz P, Vázquez L, Díez-Baños P, Morrondo P. (2013) Prevalence and identity of *Sarcocystis* spp. in roe deer (*Capreolus capreolus*) in Spain: a morphological study. *Res Vet Sci*, 95: 1036–1040.
- Pipia AP, Varcasia A, Dessì G, Panzalis R, Gai C, Nonnis F, Veronesi F, Tamponi C, Scala A. (2018) Seroepidemiological and biomolecular survey on *Toxoplasma gondii* infection on organic pig farms. *Parasitology Research*, 117 (5): 1637–1641.
- Pipia AP, Varcasia A, Tamponi C, Sanna G, Soda M, Paoletti B, Traversa D, Scala A. (2014) Canine giardiasis in Sardinia Island, Italy: Prevalence, molecular characterization, and risk factors. *Journal of Infection in Developing Countries*, 8 (5): 655–660.
- Pitlik SD, Fainstein V, Garza D, Guarda L, Bolivar R, Rios A, Hopfer RL, Mansell PA. (1983) Human cryptosporidiosis: spectrum of disease. Report of six cases and review of the literature. *Arch Intern Med*, 143: 2269–2275.
- Plotkowiak J. (1973) Inwazja *Sarcocystis hominis* nowy problem parazytologiczny w Polsce. *Ann Acad Med Stetin*, 10: 53–55.
- Plotkowiak J. (1976) Wyniki dalszych badan nad wystepowaniem i epidemiologia inwazji *Isospora hominis* (Railliet and Lucet, 1891). *Wiad Parazytol*, 22: 137–147.
- Plotkowiak J, Klasa IA. (1973) Opis pierwszego przypadku inwazji *Isospora hominis* w Polsce. *Wiad Parazytol*, 19: 725–730.
- Plutzer J, Ongerth J, Karanis P. (2010) *Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: Facts and open questions *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 213 (5): 321–333.
- Plutzer J, Tomor B. (2009) The role of aquatic birds in the dissemination of human pathogenic *Giardia duodenalis* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in Hungary. *Parasitol Int*, 58: 227–231.

- Pönkä A, Kotilainen H, Rimhanen-Finne R, Hokkanen P, Hänninen ML, Kaarna A, Meri T, Kuusi M. (2009) A foodborne outbreak due to *Cryptosporidium parvum* in Helsinki, November 2008. *Euro Surveill*, 14(28).
- Porter JD, Gaffney C, Heymann D, Parkin W. (1990) Food-borne outbreak of *Giardia lamblia*. *Am. J. Public Health*, 80: 1259–1260.
- Pozio E. (2008) Epidemiology and control prospects of foodborne parasitic zoonoses in the European Union. *Parassitologia*, 50: 17–24.
- Prasad KJ. (2010) Emerging and re-emerging parasitic diseases. *Journal International Medical Sciences Academy*, 23: 45–50.
- Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW, Constable PD. (2008) Diseases associated with protozoa. 10th Edn. In: *Veterinary Medicine: A Textbook of Diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats*. Saunders Elsevier. pp: 1483–1540.
- Radostits OM, Acres SD. (1983) The control of acute undifferentiated diarrhea of newborn beef calves. *The Veterinary clinics of North America. Large Animal Practice*, 5 (1): 143–155.
- Rinaldi L, Scala A. (2008) Toxoplasmosis in livestock in Italy: an epidemiological update. *Parassitologia*, 50(1–2): 59–61.
- Robertson LJ, Gjerde BK. (2004) Effects of the Norwegian winter environment on *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts. *Microb Ecol*, 47: 359–365.
- Robertson LJ. (2009) *Giardia* and *Cryptosporidium* infections in sheep and goats: a review of the potential for transmission to humans via environmental contamination. *Epidemiology and Infection*, 137 (7): 913–921.
- Robertson LJ, Chalmers RM. (2013) Foodborne cryptosporidiosis: is there really more in Nordic countries? *Trends Parasitol*, 29: 3–9.

- Rommel M, Heydorn AO. (1972) Beitrage zum Lebenszyklus der Sarkosporidien. III. *Isospora hominis* (Railiet und Lucet, 1891) Wenyon 1923, eine Dauerform des Sarkosporidien des Rindes und des Schweins. Berl Munch Tierarztl Wochenschr, 85: 143–145.
- Roy SS, Sarkar S, Batabyal S, Pramanik AK, Das P. (2006) Observations on the epidemiology of bovine cryptosporidiosis in India. Veterinary Parasitology, 141 (3): 330–333.
- Ryan U, Fayer R, Xiao L. (2014) *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. Parasitology, 141: 1667–1685.
- Ryan U, Zahedi A, Paparini A. (2016) *Cryptosporidium* in human and animals—a one health approach to prophylaxis. Parasite Immunology, 38 (9): 535–547.
- Sackey ME, Weigel MM, Armijos RX. (2003) Predictors and nutritional consequences of intestinal parasitic infections in rural Ecuadorian children. J Trop Pediatr, 49: 17–23.
- Saha AK, Srivastava PS, Sinha SRP. (1985) Toxic effect of the extract of *Sarcocystis fusiformis* to laboratory mice. Indian J Anim Sci, 55: 656–658.
- Saito M, Taguchi K, Shibata Y, Kobayashi T, Shimura K, Itagaki H. (1995) Toxicity and properties of the extract from *Sarcocystis cruzi* cysts. J Vet Med Sci, 57(6): 1049–51.
- Saito M, Shibata Y, Kubo M, Itagaki H. (1997) *Sarcocystis mihoensis* n. sp. from sheep in Japan. J Vet Med Sci Jpn, 59: 103–106.
- Saleque A, Bhatia BB, Juyal PD, Rahman H. (1991) Toxicity of cyst extract of *Sarcocystis fusiformis* from buffalo in rabbits and mice. Vet Parasitol, 38: 61–65.
- Sanna (1994) I protozoi intestinali dell'uomo *Giardia* spp. e *Blastocystis hominis*: nuove problematiche. Tesi di dottorato, A.A 1993-1994.

Santín M, Trout JM, Fayer R. (2007) Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* species and genotypes in sheep in Maryland. *Vet Parasitol*, 146(1-2): 17–24.

Santín M, Trout JM, Xiao L, Zhou L, Greiner E, Fayer R. (2004) Prevalence and age-related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. *Veterinary Parasitology*, 122 (2): 103–117.

Savini G, Dunsmore J, Robertson I, Seneviratna P. (1992) The epidemiology of *Sarcocystis* spp. in cattle of Western Australia. *Epidemiol Infect*, 108: 107–113.

Scala A, Nieddu AM. (1990) La sarcosporidiosi dell'ovino in Sardegna. *Parassitologia*, 32: 249–250.

Scala A, Cadeddu F, Sechi F, Sedda G, Ripoché M, Varcasia A, Mula P, Giobbe M, Giannetto S, Mulas D. (2008) Le sarcosporidiosi ovine in Sardegna: note epidemiologiche sulle forme macroscopiche trasmesse dal gatto. *Large Anim Rev*, 14: 223.

Scala A, Giobbe M, Mula PP, Pipia AP, Sanna-Coccone G, Firinu A, Varcasia A, Marrosu R, Garippa G. (2008) Toxoplasmosi dei suidi in Sardegna: indagine sieroepidemiologica. *Parassitologia*, 50: 235.

Shahari S, Tengku-Idris TIN, Fong MY, Lau YL. (2016) Molecular evidence of *Sarcocystis nesbitti* in water samples of Tioman Island, Malaysia. *Parasit Vectors*, 9: 598. pmid:27881179

Shields JM, Gleim ER, Beach MJ. (2008) Prevalence of *Cryptosporidium* spp. And *Giardia intestinalis* in swimming pools, Atlanta, Georgia. *Emerg Infect Dis*, 14: 948–950.

Šlapeta J. (2013) Cryptosporidiosis and *Cryptosporidium* species in animals and humans: a thirty colour rainbow? *International Journal for Parasitology*, 43 (12): 957–970.

Slesak G, Schafer J, Langeheinecke A, Tappe D. (2015) Prolonged clinical course of muscular sarcocystosis and effectiveness of cotrimoxazole among travelers to Tioman Island, Malaysia, 2011-2014. *Clin Infect Dis*, 60: 329.



Slesak G, Tappe D, Keller C, Cramer J, Guthoff W, Zanger P, Frank M, Ernestus K, Rauthe S, Stic A, Schafer J. (2014) Muscular sarcocystosis after travel to Malaysia: a case series from Germany. *Dtsch Med Wochenschr*, 139: 990–995.

Slifko TR, Smith HV, Rose JB. (2000) Emerging parasite zoonoses associated with water and food. *Int J Parasitol*, 30:1379–1393.

Smith HV, Cacciò SM, Cook N, Nichols RAB, Tait A. (2007) *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. *Veterinary Parasitology*, 149 (1-2): 29–40.

Smith HV, Rose JB. (1998) Waterborne cryptosporidiosis: current status. *Parasitol Today*, 14: 14–22.

Smith MO, George LW. (2009) Diseases of the nervous system. In: Smith, B.P. (Eds): *Large Animal Internal Medicine*. Mosby, Elsevier, St. Louis.

Sréter T, Varga I. (2000) Cryptosporidiosis in birds—a review. *Veterinary Parasitology*, 87: 261–279.

Starkey SR, Zeigler PE, Wade SE, Schaaf SL, Mohammed HO. (2006) Factors associated with shedding of *Cryptosporidium parvum* versus *Cryptosporidium bovis* among dairy cattle in New York State. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 229: 1623–1626.

Svärd SG, Hagblom P, Palm JE. (2003) *Giardia lamblia*—a model organism for eukaryotic cell differentiation. *FEMS Microbiol. Lett*, 218: 3–7.

Szostakowska B, Kruminis-Lozowska W, Racewicz M, Knight R, Tamang L, Myjak P, Graczyk T. (2004) *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* recovered from flies on a cattle farm and in a landfill. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (6): 3742–3744.

Tadros W, Laarman JJ. (1977) Studies on sarcosporidiosis and *Sarcocystis*-induced coccidiosis in man, monkeys and other animals. *Abstr 5th Int Congr Protozool*, 26 June to 2 July 1977.

Takizawa MG, Falavigna DL, Gomes ML. (2009) Enteroparasitosis and their ethnographic relationship to food handlers in a tourist and economic center in Paraná, Southern Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 51: 31–35.

Tappe D, Abdullah S, Heo CC, Kannan Kutty M, Latif B. (2013) Human and animal invasive sarcocystosis in Malaysia—recent cases, review and hypotheses. *Trop Biomed*, 30: 355–366.

Tappe D, Stich A, Langeheinecke A, von Sonnenburg F, Muntau B, Schafer J, Slesak G. (2014) Suspected new waves of muscular sarcocystosis in travelers returning from Tioman Island, Malaysia. *Euro Surveill* 19(21):pii=20816

Tedde T, Piras G, Salza S, Nives RM, Sanna G, Tola S, Culurgioni J, Piras C, Merella P, Garippa G, Virgilio S. (2013) Investigation into *Cryptosporidium* and *Giardia* in bivalve mollusks farmed in sardinia region and destined for human consumption. *Italian Journal of Food Safety*, 2 (2): 91–93.

Tenter AM. (1995) Current research on *Sarcocystis* species of domestic animals. *Int J Parasitol*, 25: 1311–1330.

Thompson RC, Hopkins RA, Homan WL. (2000) Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* infecting mammals. *Parasitol Today*, 16: 210–218.

Thompson RC, Monis PT. (2004) Variation in *Giardia*: Implications for taxonomy and epidemiology. *Adv Parasitol*, 58: 69–137.

Tian M, Chen Y, Wu L, Rosenthal BM, Liu X, He Y. (2012) Phylogenetic analysis of *Sarcocystis nesbitti* (Coccidia: *Sarcocystidae*) suggests a snake as its probable definitive host. *Vet Parasitol*, 183: 373–376.

Titilincu A, Mircean V, Blaga R, Bratu CN, Cozma V. (2008) Epidemiology and etiology in sheep sarcocystosis. *Bull UASVM Vet Med*, 65 (2): 50–54.

Van den Enden E, Prae M, Joos R, Van Gompel A, Gigasse P. (1995) Eosinophilic myositis resulting from sarcocystosis. *J Trop Med Hyg*, 98: 273–276.

Van Dyke MI, Ong CS, Prystajec NA, Isaac-Renton JL, Huck PM. (2012) Identifying host sources, human health risk and indicators of *Cryptosporidium* and *Giardia* in a Canadian watershed influenced by urban and rural activities. *Journal of Water and Health*, 10: 311–323.

Velásquez JN, Di Risio C, Etchart CB, Chertcoff AV, Mendez N, Cabrera MG, Labbé JH, Carnevale S. (2008) Systemic sarcocystosis in a patient with acquired immune deficiency syndrome. *Hum Pathol*, 39: 1263–1267.

Vergara C, Quílez J. (2004) Criptosporidiosis: una zoonosis parasitaria. *Revista MVZ Córdoba*, 9 (1): 363–372.

Vernile A, Nabi AQ, Bonadonna L, Briancesco R, Massa S. (2009) Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Italian water supplies. *Environ Monit Assess*, 152: 203–207.

Wade SE, Mohammed HO, Schaaf SL. (2000) Prevalence of *Giardia* sp *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium muris* (*C. andersoni*) in 109 dairy herds in five counties of southeastern New York. *Vet Parasitol*, 93: 1–11.

Waltner-Toews D, Martin SW, Meek AH. (1986) Dairy calf management, morbidity and mortality in Ontario Holstein herds. III. Association of management with morbidity. *Preventive Veterinary Medicine*, 4 (2): 137–158.

Weiss LM. (2008) Zoonotic Parasitic Diseases: Emerging issues and Problems. *Int J Parasitol*, 38(11): 1209–1210.

Wheater PR, Burkitt HG, Daniels VG. (1987) *Texto y Atlas en color de Histología Funcional*. Ed JIMS, Barcelona, 348 pp.

Wolfe MS. (1992) Giardiasis. *Clin Microbiol Rev*; 5: 93–100.

- Wolska-Kusnierz B, Bajer A, Caccio S, Heropolitanska-Pliszka E, Bernatowska E, Socha P. (2007) *Cryptosporidium* infection in patients with primary immunodeficiencies. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 45: 458–64.
- Wouda W, Snoep JJ, Dubey JP. (2006) Eosinophilic myositis due to *Sarcocystis hominis* in a beef cow. *J Comp Pathol*, 135(4): 249–53.
- Xiao L. (2010) Molecular epidemiology of Cryptosporidiosis: an update. *Experimental Parasitology*, 124: 80–89.
- Xiao L. (1994) *Giardia* infection in farm animals. *Parasitol Today*, 10: 436–438.
- Xiao L, Fayer R. (2008) Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. *International Journal for Parasitology*, 38 (11): 1239–1255.
- Xiao L, Feng Y. (2008) Zoonotic cryptosporidiosis. *Immunology and Medical Microbiology*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 52 (3): 309–323.
- Xiao L, Fayer R, Ryan U, Upton SJ. (2004) *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(1): 72–97.
- Xiao L, Bern C, Limor J, Sulaiman I, Roberts J, Checkley W, Cabrera L, Gilman RH, Lal AA. (2001) Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. *The Journal of Infectious Diseases*, 183 (3): 492–497.
- Xiao L, Herd RP, McClure KE. (1994) Periparturient rise in the excretion of *Giardia* sp. Cyst and *Cryptosporidium parvum* oocysts as a source of infection for lambs. *J parasitol*, 80: 55–59.
- Xiao L, Ryan UM. (2004) Cryptosporidiosis: an update in molecular epidemiology. *Curr Opin Infect Dis*, 17: 483–490.

Yang ZQ, Zuo YX, Yao YG, Chen XW, Yang GC, Zhang YP. (2001) Analysis of the 18S rRNA genes of *Sarcocystis* species suggests that the morphologically similar organisms from cattle and water buffalo should be considered the same species. *Mol Biochem Parasitol*, 115: 283–288.

Yang ZQ, Wei CG, Zen JS, Song JL, Zuo YX, He YS, Zhang HF, Attwood SW, Chen XW, Yang GC, Zhou X, Quan X, Li CY, Han D, Liu AW, Lin P. (2005) A taxonomic re-appraisal of *Sarcocystis nesbitti* (Protozoa: Sarcocystidae) from the monkey *Macaca fascicularis* in Yunnan, PR China. *Parasitol Int*, 54: 75–81.

Yoder JS, Hlavsa MC, Craun GF, Hill V, Roberts V, Yu PA, Hicks LA, Alexander NT, Calderon RL, Roy SL, Beach MJ (2008). Surveillance for waterborne disease and outbreak associated with recreational water use and other aquatic facility-associated health events - United States, 2005-2006. *MMWR Surveill Summ*, 57 (9): 1–29.

Zhou L, Singh A, Jiang J, Xiao L. (2003) Molecular surveillance of *Cryptosporidium* spp. in raw wastewater in Milwaukee: implications for understanding outbreak occurrence and transmission dynamics. *Journal of Clinical Microbiology*, 41 (11): 5254–5257.

Ziegler PE, Wade SE, Schaaf SL, Chang YF, Mohammed HO. (2007) *Cryptosporidium* spp. from small mammals in the New York City watershed. *Journal of Wildlife Diseases*, 43: 586–96.