



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI**

**SCUOLA DI DOTTORATO IN**

**RIPRODUZIONE, PRODUZIONE, BENESSERE ANIMALE E SICUREZZA  
DEGLI ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE**

Direttore: Prof. Sergio Ledda

**INDIRIZZO: Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale (XXVI CICLO)**

Coordinatore: prof. Enrico De Santis

**Le trematodosi di interesse ispettivo nei ruminanti della  
Sardegna: rilievi tassonomici biomolecolari, aggiornamenti  
epidemiologici e valutazione protocolli terapeutici**

**Docente Guida**

**Prof. Antonio Scala**

**Direttore**

**Prof. Sergio Ledda**

**Tesi di dottorato della**

**Dr.ssa Giuliana Sanna**

**ANNO ACCADEMICO 2012 – 2013**





Unione europea  
Fondo sociale europeo



REPUBBLICA ITALIANA



REGIONE AUTONOMA DE SARDIGNA  
REGIONE AUTONOMA DELLA SARDEGNA



FSE 2007-2013  
POR  
SARDEGNA  
obiettivo competitività regionale e occupazione



A.D. MDLXII

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

SCUOLA DI DOTTORATO IN

**RIPRODUZIONE, PRODUZIONE, BENESSERE ANIMALE E SICUREZZA  
DEGLI ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE**

Direttore: Prof. Sergio Ledda

INDIRIZZO: **Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale (XXVI CICLO)**

coordinatore: Prof. Enrico De Santis

**Le trematodosi di interesse ispettivo nei ruminanti della  
Sardegna: rilievi tassonomici biomolecolari, aggiornamenti  
epidemiologici e valutazione protocolli terapeutici**

**Docente Guida**

**Prof. Antonio Scala**

**Direttore**

**Prof. Sergio Ledda**

**Tesi di dottorato della**

**Dr.ssa Giuliana Sanna**

**ANNO ACCADEMICO 2012 – 2013**

La presente tesi è stata prodotta nell'ambito della Scuola di dottorato in Riproduzione, Produzione, Benessere Animale e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale dell'Università degli Studi di Sassari – XXVI ciclo, con il supporto di una borsa di studio finanziata con le risorse del P.O.R. SARDEGNA F.S.E. 2007-2013 - Obiettivo competitività regionale e occupazione, Asse IV Capitale umano, Linea di Attività 1.3.1.

# INDICE GENERALE

	pag.
1. Introduzione.....	1
2. Caratteristiche generali trematodi .....	4
2.1. Dicroceliosi da <i>Dicrocoelium dendriticum</i> .....	5
2.2. <i>Fasciola hepatica</i> .....	15
2.3. Paramfistomidi .....	43
2.4. Chiavi tassonomiche storiche paramfistomidi.....	53
3. Generalità sui farmaci utilizzati nei trials .....	59
3.1. Generalità sull'albendazolo .....	59
3.2. Generalità sull'ossiclozanide .....	61
4. Materiali e Metodi.....	64
4.1. Tecniche copromicroscopiche usate .....	64
4.2. Rilievi epidemiologici ovini .....	66
4.3. Questionario sul controllo della dicroceliosi ovina .....	67
4.4. Trials di campo ovini .....	68
4.5. Rilievi epidemiologici bovini .....	72
4.6. Trials di campo paramfistomosi e dicroceliosi bovina....	73
4.7. Calcolo efficacia trattamenti antiparassitari .....	74
4.8. Prova tassonomica biomolecolare paramfistomidi.....	74
5. Risultati .....	76
5.1. Rilievi epidemiologici ovini .....	76
5.2. Questionario sul controllo della dicroceliosi ovina.....	77

5.3. Trials di campo ovini .....	79
5.4. Rilievi epidemiologici bovini .....	82
5.5. Trials di campo bovini .....	83
5.6. Prova tassonomica biomolecolare paramfistomidi .....	84
6. Discussione.....	86
7. Conclusioni.....	99
8. Bibliografia.....	102
9. Ringraziamenti .....	129
10. Tabelle .....	130
11. Figure.....	139
12. Documentazione fotografica .....	140

## 1. INTRODUZIONE

Le trematodosi dei ruminanti di interesse ispettivo sono delle elmintosi essenzialmente riportabili a *Fasciola hepatica* e *D. dendriticum*, denominate distomatosi epatiche e, anche se meno presa in considerazione, quella da paramfistomidi, responsabile invece della distomatosi gastro-intestinale. Queste risultano soprattutto legate all'allevamento brado e semi-brado in particolari ambienti che consentano la presenza degli ospiti intermedi, indispensabili per perpetuare il rispettivo ciclo biologico.

I danni zootecnico-sanitari possono essere rilevanti a causa del sequestro degli organi parassitati all'atto della visita post-macellazione e delle perdite produttive da essi arrecate, quali i minori incrementi ponderali negli animali da carne, la minor produzione latte, le spese relative ai trattamenti farmacologici messi in atto per un loro controllo e al problema conseguente dei residui negli alimenti derivanti dalle produzioni di questi animali (Ambrosi, 1995).

La loro diffusione in certi distretti geografici può essere molto elevata, contribuendo quindi a rendere sicuramente meno redditizio l'allevamento stesso.

La Sardegna rappresenta una regione in cui tali parassitosi hanno costituito una importante noxa sanitaria dei ruminanti allevati con cui allevatori e veterinari hanno storicamente sempre dovuto fare i conti, basti pensare infatti che la loro diffusione ha determinato la promulgazione negli anni '50 di un'apposita legge speciale da parte dell'Assessorato all'Agricoltura e Foreste che rendeva obbligatoria la profilassi della distomatosi epatica attraverso un trattamento terapeutico annuale degli animali infestati o ritenuti tali (Legge del 23 giugno 2013).

Da qui la necessità di avere a disposizione, soprattutto in queste aree geografiche a rischio di tali infestioni, per un loro controllo efficace ed economicamente valido, di dati epidemiologicamente aggiornati e di presidi diagnostico-terapeutici validati.

Tuttavia, soprattutto la paramfistomosi e la dicroceliosi dei ruminanti rappresentano dei problemi zootecnico-sanitari spesso di non facile soluzione, in rapporto a diversi fattori quali soprattutto:

a) l'utilizzo di protocolli diagnostici non efficaci, come ad esempio l'uso di metodiche e/o soluzioni flottanti non appropriate per la ricerca delle uova (fattore comune anche alla fasciolosi);

b) le difficoltà legate all'individuazione sul mercato italiano di presidi antielmintici specifici nel caso della dicroceliosi e delle paramfistomosi; venuta meno infatti la disponibilità del tiofanato, (farmaco ritenuto d'elezione per *D. dendriticum*), a causa della scarsa convenienza economica della valutazione delle MRL (Maximum Residue Limits) da parte della ditta produttrice di allora, non esiste attualmente una molecola specifica per questo trematode, così come purtroppo non esiste una formulazione a base esclusivamente di ossiclozanide per la terapia dei paramfistomidi;

c) la non facile attuazione di piani di profilassi ambientale atti a rendere non idoneo l'habitat agli ospiti intermedi e, nel caso specifico della paramfistomosi, il generale mancato ricorso all'esame parassitologico diretto dei prestomaci negli animali regolarmente macellati, venendo quindi meno anche la "credibilità" del mattatoio quale osservatorio epidemiologico privilegiato.

Per apportare un contributo al controllo di queste parassitosi e per poter meglio valutare anche i loro possibili risvolti ispettivi, riportiamo in questa sede i risultati di una ricerca volta a:

1) aggiornare i dati sulla loro diffusione in Sardegna tramite analisi copro-microscopiche attuate con metodiche appropriate e maggiormente performanti per i trematodi di solito non adottate nei laboratori diagnostici che garantiscono i referti sul territorio (flottazione in centrifuga e uso della tecnica Flotac<sup>®</sup>) e con esami parassitologici diretti del fegato e dei prestomaci di ovini e bovini regolarmente macellati;

- 2) allestire un questionario da rivolgere a veterinari aziendali sulle modalità attuate in Sardegna per il controllo della dicroceliosi ovina;
- 3) valutare sul campo l'efficacia dell'albendazolo, molecola più importante usata attualmente nelle infestazioni da *D. dendriticum* sul territorio (Scala et al., 1999) e confrontare l'efficacia di albendazolo e ossiclozanide/levamisolo in quelle da paramfistomidi per individuare protocolli terapeutici più efficaci in grado di aumentare le performances produttive degli animali e ridurre le perdite legate al sequestro del fegato nel caso della dicroceliosi;
- 4) identificare la/le specie di paramfistomidi presente/i nella nostra isola, in quanto le nuove acquisizioni tassonomiche inerenti questo gruppo di parassiti hanno subito importanti aggiornamenti grazie ai recenti studi biomolecolari. Un'indagine effettuata da Rinaldi et al. (2005) ha discriminato infatti *Calicophoron daubneyi* da altri paramfistomidi che infestavano ovini, bovini e bufali del Sud Italia (Campania, Calabria e Puglia). Per questo motivo abbiamo voluto condurre un'indagine in Sardegna sulla falsa riga di quella dei colleghi partenopei, includendo non solo esemplari dei parassiti isolati nel campionamento del presente lavoro ma anche provenienti dalla collezione storica del Settore di Parassitologia. Sono stati inoltre inclusi nell'indagine biomolecolare dei parassiti provenienti dall'Argentina, classificati morfologicamente e biomolecolarmente come *Paramphistomum leydeni*, che sono stati usati in questo lavoro sia come outgroup a livello biomolecolare che come riferimento per la morfologia. Tale step della ricerca risulta particolarmente importante in quanto, a seconda della specie presente, cambia l'ospite intermedio e quindi anche le caratteristiche degli ambienti a rischio e di conseguenza probabilmente anche gli aspetti epidemiologici, fattori questi importanti per valutare il trend della parassitosi stessa.



## 2. CARATTERISTICHE GENERALI DEI TREMATODI

I trematodi adulti, detti comunemente distomi, ad eccezione dei paramfistomidi, sono parassiti appiattiti dorso-ventralmente, che vivono nel fegato, nei prestomaci e nei vasi sanguigni di una vasta gamma di animali, uomo compreso. Sono rivestiti da una cuticola sinciziale liscia o spinulata delimitata, nella superficie esterna, da una membrana plasmatica esterna (Casarosa, 1980). Questa è tappezzata da una sorta di rivestimento di notevolissima importanza, quale mezzo d'evasione dell'elminta dalle difese dell'ospite, detto membranocalice o glicocalice, che si rinnova continuamente. Le ventose, solitamente sono in numero di due: la ventosa orale, provvista di papille sensoriali è situata generalmente all'estremo prossimale del corpo del trematode; la ventosa ventrale o posteriore (comunemente detta acetabulo), posta sulla faccia ventrale del parassita a distanza varia dalla prima, anche in posizione del tutto distale. Gli orifici sono: l'orificio buccale, che si apre al centro della ventosa orale, l'orificio o poro genitale e il poro escretore.

I trematodi sono forniti di vari apparati e sistemi immersi nella loggia parenchimale. L'apparato digerente inizia con l'orificio buccale e termina a fondo cieco. Consta di prefaringe e faringe, esofago, intestino diviso in due branche, semplici o ramificate terminanti a fondo cieco. In alcune specie non termina a fondo cieco, ma si apre nell'apparato escretore e in altre sbocca in uno o due orifici anali. Gli intestini sono tappezzati da epitelio monostratificato con funzione secernente e assorbente.

Manca l'apparato respiratorio e anche un vero e proprio apparato circolatorio.

Nella famiglia Paramfistomidae è presente un sistema linfatico primitivo. L'apparato escretore si origina da cellule a fiamma, o cellule cave internamente fornite di ciglia. Il numero di cellule a fiamma presenti è specie specifico ed ha quindi valore tassonomico. Le cellule a fiamma sboccano in canalicoli o protonefridi, i quali confluiscono in due collettori longitudinali (vasi acquiferi) che, all'estremo distale del corpo del trematode, si riuniscono in un collettore unico che sbocca all'esterno mediante un poro escretore (Casarosa, 1980). Il sistema nervoso è costituito da un cingolo sopraesofageo formato da fibre e gangli nervosi, dal quale si dipartono fibre destinate alle varie regioni del corpo del trematode, in particolare alle ventose. L'apparato genitale è complesso: i trematodi Digenea, ad eccezione di quelli della famiglia Schistosomatidae, sono tutti ermafroditi. Gli organi genitali maschili sono

costituiti da uno, due o più testicoli lobati o ramificati, canali deferenti, vescicola seminale, dotto eiaculatore, cirro. Gli organi genitali femminili constano di un ovaio dal quale si diparte un ovidotto che, ricevuto lo sbocco del dotto unico di confluenza dei due vitello dotti provenienti dalle ghiandole vitellogene, confluisce nell'ootipo.

Qui prende inizio l'utero, un tubulo più o meno flessuoso.

Gli apparati maschile e femminile terminano in un poro genitale entro un atrio comune, l'atrio genitale. I trematodi di interesse veterinario fanno tutti capo all'ordine Digenea e al sottordine Protostomata, suddiviso in molteplici famiglie. Nei ruminanti per la loro importanza vanno annoverati in particolare: *Dicrocoelium dendriticum*, *Fasciola hepatica* e i paramfistomidi.

### **2.1. Dicroceliosi da *Dicrocoelium dendriticum***

La dicroceliosi è una malattia parassitaria diffusa in tutto il mondo causata da *Dicrocoelium* spp. (Trematoda, Dicrocoeliidae), ma principalmente da *Dicrocoelium dendriticum* e talvolta anche da *D. hospes*, *D. chinensis* e *D. suppereri*. Questo parassita è comunemente chiamato “lancet fluke” o “small liver fluke”.

#### **Morfobiologia**

L'adulto di *D. dendriticum* ha forma lanceolata, presenta una lunghezza di 8-14 mm e una larghezza di 2-3 mm (foto n°1). Le uova sono piccole, ovali, marrone scuro e opercolate (35-45 micron × 22-30 micron) (foto n°2), dotate di una notevole resistenza sia alle basse temperature che alla disidratazione. Il suo ciclo di vita è abbastanza complesso, della durata di circa 6 mesi, e si svolge in due ospiti intermedi: i primi sono dei gasteropodi terrestri e i secondi delle formiche. Più di 90 specie di molluschi possono comportarsi come ospiti intermedi di dicroceliosi e alcuni di essi sono presenti in tutto il mondo (es. *Cochlicopa lubrica*), mentre altri sono solo regionale (*Helicella corderoi* in Spagna, *Zebrina hohenackeri* nel Caucaso, *Helicella obvia* in Germania, *Cerņuella virgata* e *Cochlicella acuta* in Italia) (foto n°3) (Fasanella et al., 1995). Al momento dell'escrezione con le feci degli ospiti definitivi, le uova presentano un miracidio sviluppato; questo, dopo essere stato ingerito dai molluschi, migra dall'intestino delle lumache e si porta in posizione parenterale dando luogo a sporocisti (*sporocisti di prima generazione*) da cui derivano altre sporocisti (*sporocisti di seconda generazione*). Da queste ultime in 3-4 mesi hanno infine luogo le cercarie. Manca dunque lo stadio di redia. Singoli

molluschi possono contenere fino a 300 sporocisti, ciascuna delle quali può originare 40 cercarie. Il ciclo del mollusco dura circa 100 giorni. Le cercarie, che si accumulano nella camera respiratoria, sono espulse dai molluschi avvolte, a gruppi da 100 a 300, entro singoli gruppi mucosi (“slime balls”). Tale espulsione di solito avviene dopo copiose piogge che seguono lunghi periodi di siccità, quindi quando la temperatura si abbassa e l’umidità sale a valori abbastanza alti. I grumi mucosi vengono ingeriti dalle formiche (generalmente *Formica fusca*, *Formica rufibarbis*, etc) e le cercarie raggiungono la fase di metacercaria (dimensioni di 325-465  $\mu$  x 135-250  $\mu$ ) nell'addome 1-2 mesi dopo l'infestazione (Otranto e Traversa, 2002). Almeno una cercaria, ma a volte 2 o 3, si stabiliscono nel ganglio bulboesofageo (“brain worm”), causando una tetania dei muscoli della mandibola quando la temperatura scende al di sotto di 15 °C (ad esempio la mattina presto e nel tardo pomeriggio). Le formiche rimangono temporaneamente fissate alle foglie o agli steli d’erba, fino al mattino successivo, quando con il rialzo della temperatura cesserà il trisma mandibolare, e sono quindi facilmente ingerite dagli ospiti definitivi. Ogni formica è in grado di contenere oltre 100 metacercarie. In seguito all’ingestione, le metacercarie si disincistano grazie all’azione degli enzimi duodenali e le cercarie migrano risalendo attraverso il coledoco verso la cistifellea e i grossi dotti biliari, dove diventano adulti in 72-85 giorni senza effettuare alcuna migrazione nel parenchima epatico. Gli adulti si riproducono per ermafroditismo o cross inseminazione (Krull, 1958) e in seguito le uova vengono rilasciate nelle feci dopo circa 2 mesi dall’infestazione.

### **Note epidemiologiche**

La distribuzione di queste specie è diversa: *D. dendriticum* è presente in tutta Europa, Asia, Nord Africa e Nord America (Soulsby, 1968), mentre le altre specie hanno una distribuzione limitata e sono presenti in Africa, Asia e in alcune aree dell'Europa orientale (Lucius, 1981; Hinaidy, 1983; Tang et al., 1983).

Gli elminti adulti vivono nei dotti biliari e nella cistifellea dei mammiferi ospiti definitivi, soprattutto ruminanti domestici e selvatici, ma possono essere infestati anche conigli, maiali, cani, cavalli ed esseri umani. L'importanza relativa della dicroceliosi nei ruminanti è stata riportata da Ducháček e Lamka (2003) che hanno descritto una prevalenza fino al 32% in Germania nel corso del 1975, del 54 % in

Slovacchia durante il 1984-1986, del 21% in Ungheria nel 1993 e tra il 27 % e il 63 % nel nord della Spagna durante il 1991-1993.

La dicroceliosi è presente in tutto il mondo in pianura o negli alpeggi cioè in tutti quegli ambienti che forniscono le condizioni adeguate per la sopravvivenza e lo sviluppo degli ospiti intermedi, le lumache terrestri e le formiche, ma è stata descritta soprattutto nelle pecore e nelle capre, piuttosto che nei bovini (Ducommun e Pfister, 1991).

In generale, a differenza di *Fasciola* spp., gli ospiti intermedi di *D. dendriticum* non richiedono ambienti umidi e sono ampiamente presenti nei pascoli (Manga-González et al., 2001). La dicroceliosi è comune nelle greggi di pecore con una prevalenza massima del 100 % in molti paesi europei e dell'Est (Manga-González et al., 1991), ed è stata riportata anche in Africa occidentale (*D. hospes*) (Malek, 1980; Asanji e Williams, 1984). Questa parassitosi è, insieme alle strongilosi gastro-intestinali, quella più diffusa nel territorio nazionale compresa la Sardegna (Ambrosi, 1995). Nell'isola la dicroceliosi purtroppo risulta, in base ai dati copromicroscopici ottenuti nel nostro laboratorio, particolarmente presente in alcuni distretti le cui caratteristiche pedoclimatiche favoriscono lo sviluppo degli ospiti intermedi.

Le indagini copromicroscopiche condotte nel triennio 1985/87 hanno consentito di evidenziare le uova di questo trematode in percentuali variabili dal 5,5% al 24,5% negli agnelli e dal 12,5% al 38% negli ovini adulti allevati in aree del centro Sardegna (Sanna et al., 1989). Altre indagini condotte nel 1991 su fegati di ovini regolarmente macellati allevati in aree pascolative di comuni in provincia di Sassari hanno consentito di rilevare la presenza di esemplari di *D. dendriticum* nel 31,1% dei soggetti allevati in agro di Porto Torres e nel 58,6% di quelli di Ploaghe, per un totale complessivo dei tassi di prevalenza pari al 50,3%, con cariche parassitarie medie di 137,8 esemplari/capo (range da 16 a 828) (Scala, 1991). In questo studio, le indagini non evidenziavano alterazioni patologiche dei valori degli acidi biliari, delle Gamma GT e della ALP, anche se questi risultavano superiori nei soggetti positivi rispetto a quelli negativi al parassita (Scala, 1991). Indagini analoghe condotte su ovini allevati in provincia di Cagliari regolarmente macellati nel corso del 1998 consentivano di rilevare il trematode nel 10% dei soggetti controllati, nei quali nel

57,1% dei casi si riscontravano meno di 100 esemplari in localizzazione (Scala et al., 2000).

Il piccolo trematode epatico colpisce anche i ruminanti selvatici come i camelidi (lama e alpaca) in America del Sud (Wenker et al, 1998; Gunsser et al, 1999 ), yak (Somvanshi e Kaul, 1989; Jithendran e Bhat, 1996) e bufali in India, con una maggiore prevalenza nelle bufale (18,7%) rispetto ai bovini (11,4%) (Jithendran e Bhat, 1999).

Negli ultimi 50 anni, la diffusione e l'epidemiologia della dicroceliosi sono state ampiamente studiate per comprendere meglio i principali fattori che influenzano la malattia, cioè:

- 1) l'ambiente locale e i fattori ecologici;
- 2) la presenza e l'etologia degli ospiti intermedi;
- 3) la presenza di ruminanti domestici e/o selvatici.

Lo sviluppo di *D. dendriticum* sembrerebbe in relazione con le caratteristiche dei terreni calcarei e gessosi che favoriscono la crescita e la riproduzione degli ospiti intermedi (Foto n°4) (Chartier e Reche, 1992).

La dispersione delle uova e la contaminazione dei pascoli possono essere causati da ruminanti domestici e selvatici, ma anche da conigli e lepri (Boray, 1985). Le uova possono svernare e rimanere infettive per un massimo di 20 mesi sui pascoli.

In condizioni di campo è stato dimostrato che la sopravvivenza delle uova è un fenomeno stagionale (85 % in inverno e valori minimi in estate) e che non vi è alcun rapporto tra la capacità infestante delle uova e la loro età (Alunda e Rojo-Vazquez, 1983). La dinamica dell'eliminazione delle uova nelle pecore è legata alla stagione, con un picco durante l'inverno degli animali positivi (90,5%) e del numero medio di Uova Per Grammo UPG (323,4 ±18,5) (Manga-González et al., 1991). Il numero di UPG varia di giorno in giorno e il più alto tasso di escrezione avviene durante il pomeriggio (Campo et al., 2000 e Senlik et al., 2006). In condizioni di campo, la sopravvivenza delle uova è massima durante l'inverno (85%), da moderata ad elevata in primavera e in autunno (75%) e minima in estate, quando gran parte delle uova muoiono (Alunda e Rojo-Vázquez, 1983).

Questi dati sono coerenti con il ciclo di vita del trematode in Spagna, dove i giovani molluschi si infestano all'inizio della primavera, (Manga-Gonzalez, 1987) e gli ospiti

definitivi si infestano con le cercarie a partire dalla fine della primavera e l'inizio dell'autunno. Tuttavia, alcune metacercarie possono svernare nelle formiche e infestare gli ospiti definitivi all'inizio della primavera. Nel NO della Spagna, le formiche sono più attive da marzo a novembre (Manga-González e González-Lanza, 2005).

Nel secondo ospite intermedio, la dimensione e il numero delle metacercarie sono state correlate alla specie e alle dimensioni della formica; più grandi erano gli esemplari di formiche esaminati, maggiore il numero di metacercarie recuperate (Schuster, 1991).

Gli ovini sembrano essere più suscettibili alla dicroceliosi rispetto alle capre anche se non sono state registrate sostanziali differenze in termini di carica parassitaria e UPG (Jithendran e Bhat, 1996).

L'età degli animali e la relativa suscettibilità al parassita sono aspetti non ancora completamente chiariti. Alcuni autori hanno registrato UPG medie più elevate negli agnelli rispetto agli adulti (Manga-González et al., 1991) e nei bovini di età fino a 2 anni rispetto agli animali più anziani, con una leggera diminuzione graduale delle stesse con l'aumentare dell'età dell'ospite (Gonzalez-Lanza et al., 1993). Per contro, in un'altra indagine si è registrato un aumento del numero dei bovini infetti, da 24,2% nei vitelli di età inferiore ai 18 mesi, a più del 70% negli animali di età superiore a 6 anni (Ducommun e Pfister, 1991).

Fattori stressanti, come il trasporto e la stabulazione degli animali, aumentano la produzione di uova di *D. dendriticum*, probabilmente inducendo depressione immunitaria negli animali (Sotirakiet al., 1999).

Recentemente, la correlazione tra carica parassitaria ed eliminazione delle uova è stata valutata mediante l'esame necroscopico e l'analisi delle feci in due gruppi di agnelli sperimentalmente infettati con differenti dosi di metacercarie (1000 e 3000 rispettivamente). L'eliminazione delle uova, iniziata circa 2 mesi dopo l'infestazione, e il numero medio di parassiti recuperato all'autopsia (a 120-180 giorni dopo l'infestazione) è risultato maggiore negli agnelli infestati con 3000 metacercarie rispetto a quelli infestati con 1000 (Campo et al., 2000). Il sesso è stato correlato alla sensibilità degli animali al trematode, infatti l'esame necroscopico di 2.033 fegati di bovini, naturalmente infestati da *D. dendriticum*, ha rivelato una prevalenza del 62,5

% nelle femmine e del 9,8 % nei maschi. Il tasso più elevato nelle femmine può essere spiegato con il fatto che le giovenche da latte e le vacche pascolano per diverse stagioni, contraendo l'infestazione, mentre i manzi e buoi possono trascorrere un considerevole periodo della loro vita in unità d'ingrasso (Ducommun e Pfister, 1991). La stagionalità di questa infestazione è favorita dagli spostamenti degli animali dalle pianure ai pascoli montani dove vengono infestati dalle formiche per poi portare il parassita di nuovo a valle durante l'inverno. Alcune specie di ospiti intermedi (le lumache *H. obvia* e *C. lubrica* e le formiche *F. pratensis* e *F. cunicularia*) sono presenti in alpeggio in Europa fino ad altitudini di 1800-2600 sopra il livello del mare (Svizzera, Spagna, Austria) e in Asia (India) (Eckert e Hertzberg, 1994; Jithendran e Bhat, 1996).

### **Sintomatologia e lesioni**

È difficile determinare chiaramente gli effetti patogeni della dicroceliosi a causa della difficoltà a produrre le infestazioni sperimentali necessarie per definirne la patogenesi; l'osservazione di campo spesso non fornisce accurate indicazioni a causa della concomitante presenza di nematodi gastrointestinali e broncopolmonari e distomi, tutte con sintomi simili a quelli della dicroceliosi. Studi sulla patogenesi dell'infestazione sono stati effettuati da Otranto e Traversa (2002) e Manga-González et al. (2004) in condizioni sperimentali. Gli agnelli infestati mostrano un leggero aumento della bilirubina (7%) e dell'albumina (3%), non correlato alla carica parassitaria. Inoltre, durante l'infestazione vi è un aumento degli enzimi epatici aspartato aminotransferasi e alanina amino transferasi. Risultati simili sono stati riportati da Theodoridis et al. (1991), che ha sottolineato che cariche fino a 4000 trematodi adulti non causano significativa perdita di sangue o di proteine plasmatiche in pecore naturalmente infestate, al contrario delle infestazioni da *F. hepatica* (Holmes et al, 1968) e *Haemonchus contortus* (Dargie e Allonby, 1975) e questo può essere dovuto alla maggiore patogenicità di questi due ultimi elminti.

I giovani trematodi migrano direttamente al sistema duttale biliare del fegato senza attraversare la parete intestinale, la capsula e il parenchima epatico come nella fasciolosi. I sintomi clinici di solito non sono manifesti, anche nelle infestazioni massive, e pertanto, gravi lesioni a carico del fegato, sono rilevabili solo all'esame autoptico (Theodoridis et al., 1991). Gli animali affetti da dicroceliosi possono

presentare anemia, edema, dimagrimento e in casi avanzati, cirrosi, cicatrizzazione della superficie epatica, e marcata distensione dei dotti biliari. Grazie ai suoi stilette buccali, il parassita irrita le superfici del dotto biliare, causando proliferazione e alterazioni nei dotti biliari dei bordi lobulari epatici (Wolff et al., 1984; Camara et al., 1996). Una diretta correlazione è stata osservata tra carica parassitaria e score delle lesioni negli animali infestati; le lesioni macroscopiche epatiche sono state classificate in cinque diversi gradi di score, dal fegato normale al fegato indurito con cicatrici, dotti biliari marcatamente dilatati con grave fibrosi ed elevata carica parassitaria (Jithendran e Bhat, 1996). Sono state osservate modifiche lesioni fibrotiche del fegato che aumentano con il livello di infestazione fino a 300 parassiti mentre, al di sopra di questo valore fino a 600 trematodi, è stata osservata una diminuzione, forse a causa della reazione dell'ospite (Camara et al., 1996). Nelle infestazioni pesanti un gran numero di parassiti sono rilevabili all'interno dei condotti biliari e della cistifellea, il fegato risulta aumentato di volume, con dotti ispessiti, colangite, macchie biancastre sulla superficie, cicatrici e cirrosi che provocano insufficienza epatica (Jithendran e Bhat, 1996). Nei criceti infestati sperimentalmente, le alterazioni patologiche indotte dal parassita sono state caratterizzate da proliferazione dei dotti biliari, infiltrazione di linfociti, macrofagi ed eosinofili nelle vie portali, infiltrazione di collagene negli spazi portali e nei setti interlobulari, che porta all'atrofia del fegato (Sanchez-Campos et al., 2000). Dal punto di vista clinico, il segno più rilevante della dicroceliosi è una perdita del peso acquisito durante le prime fasi dell'infestazione (Salimova, 1972 e Manga-González et al., 2004). Anche in caso di infestazioni gravi, i segni clinici non sono patognomonic, gli animali possono sviluppare anemia, ittero, edemi e una riduzione della loro produzione. Più comunemente, l'infestazione è asintomatica e non ha alcun significato economico. Secondo Rojo-Vázquez et al. (1981) cariche parassitarie di meno di 1000 parassiti non provocano manifestazioni cliniche. Secondo Ambrosi (1995), un effetto negativo sulle pecore può manifestarsi invece con infestazioni attorno ai 3000 esemplari adulti in localizzazione. Secondo lo stesso autore, si può considerare grave un'infestazione da 300 a 10000 elminti circa e molto grave al di sopra di questo valore. Per valori medi di allevamento positività inferiori a 100 UPG sono trascurabili, mentre valori tra 150 e 250 UPG sono presenti quando nel fegato si



trova quella soglia di circa 3000 adulti da cui potrebbe iniziare lo squilibrio produttivo. Una media di 150-300 UPG è significativa, ma il limite soglia oltre il quale si presenta un rischio concreto è dato da medie di 300-600 UPG (Ambrosi, 1995).

Nel bovino invece i valori coproscopici sono sempre molto bassi, dato da mettere in correlazione sia con la dispersione delle uova in un'abbondante massa fecale, sia con le basse cariche elmintiche, solitamente attorno a cento esemplari, meno spesso oltre i mille e raramente oltre i duemila. Una positività può indicare un possibile rischio quando risulta attorno alle 200 UPG, anche se in genere i valori massimi individuali sono attorno alle 300 UPG.

### **Diagnosi**

La dicroceliosi spesso rimane clinicamente silente o non diagnosticata, molto probabilmente a causa della sua natura subclinica (Ducommun e Pfister, 1991). La sua diagnosi avviene principalmente in seguito al riscontro in sede autoptica degli adulti nel fegato o delle uova negli esami coprologici.

L'esame coprologico è la tecnica più comunemente usata per la diagnosi di dicroceliosi. Diversamente dai risultati ottenuti per la diagnosi di fasciolosi e paramfistomosi, le tecniche di sedimentazione non sono sufficienti ed è preferibile utilizzare una flottazione con soluzioni ad alta densità (P.S. 1,300-1,450).

Nello studio effettuato da Campo et al. nel 2000, in agnelli infestati sperimentalmente con diverse dosi di metacercarie, l'eliminazione delle uova è iniziata a 49-79 giorni dall'infestazione, il che indica che un esame coprologico negativo eseguito in tale periodo non equivale a una reale negatività parassitologica. Confrontando i risultati degli esami fecali con l'esame del fegato di ovini e caprini alla necropsia, la prima procedura ha dimostrato di rilevare la presenza di dicroceliosi soltanto in uno dei tre casi (Jitendran e Bath, 1996).

Negli ultimi 30 anni sono stati sviluppati dei metodi immunologici per la diagnosi della dicroceliosi, come alternativa agli esami coprologici e post mortem del fegato.

Sono state impiegate molte tecniche immuno-diagnostiche, come l'immunofluorescenza (Calamel, 1977), il test di fissazione del complemento, l'emoagglutinazione passiva e l'ELISA (Schröder e Geyer, 1976; Piergili Fioretti et al., 1980; Savitskii e Ponomareva, 1984; Jithendran et al., 1996) per la ricerca di

anticorpi anti-*D. dendriticum* in animali infestati naturalmente e/o sperimentalmente. I titoli anticorpali anti-*D. dendriticum* sono stati analizzati mediante ELISA e confrontati con la conta delle uova nelle feci in agnelli esposti ad infestazione naturale. Gli anticorpi sono stati rilevati nel colostro 24 ore dopo la nascita per poi scomparire del tutto entro 2-4 mesi (Baldelli et al., 1981). Dopo la prima infestazione naturale, 4-8 settimane prima della comparsa delle uova nelle feci, è stato rilevato un alto titolo anticorpale anti-*D. dendriticum* dal test ELISA mostrando che questo test è efficace per una diagnosi precoce di dicroceliosi (Ambrosi et al., 1980). In uno studio comparativo sulla sensibilità tra analisi fecali e un test ELISA indiretto per antigeni escretori-ecretori, Sánchez- Andrade et al. (2003), hanno rilevato che il 7% degli animali erano positivi in entrambe le prove, mentre l'80% delle pecore erano sieropositive, ma negative ai test fecali. Risultati simili sono stati ottenuti da Colwell e Goater (2010) nelle pecore. Secondo Ambrosi, (1991), infatti, l'analisi delle feci è di solito negativa nelle infestazioni con cariche parassitarie inferiori a 100 trematodi. Un recente studio ha notevolmente contribuito a chiarire alcuni aspetti dell'immunodiagnosi di dicroceliosi. Le IgG in due gruppi di pecore infestate sperimentalmente con 1000 e 3000 metacercarie sono state rilevate mediante ELISA 19 e 23 giorni prima della comparsa delle uova nelle feci. I titoli anticorpali hanno raggiunto un picco a 60 giorni dall'infestazione in entrambi i casi e sono rimasti alti fino alla fine della sperimentazione (180 giorni dall'infestazione). Non sono state rilevate differenze significative nei titoli anticorpali in relazione al numero di metacercarie dimostrando che non vi è alcuna correlazione tra carica parassitaria e risposta anticorpale (Gonzalez- Lanza et al., 2000). La rilevazione con l'ELISA dei titoli anticorpali anti-*D. dendriticum* è importante per gli studi sier-epidemiologici e per la diagnosi precoce di dicroceliosi negli agnelli (gli anticorpi appaiono a 30 giorni dall'infestazione) perchè permette un trattamento tempestivo evitando perdite economiche.

### **Trattamento**

Tra i farmaci antielmintici molti benzimidazolici (albendazolo, triclabendazolo, fenbendazolo, mebendazolo, cambendazolo, tiabendazolo) e derivati probenzimidazolici (tiofanato) sono stati utilizzati contro la dicroceliosi, a dosi più elevate rispetto a quelle nei confronti di cestodi e di nematodi gastrointestinali (Onar,

1990). L'albendazolo, somministrato a dosi di 15 e 20 mg / kg per os o per via intraruminale, ha causato una riduzione delle cariche medie di parassiti nel fegato di 98,2 e 99,6 %, rispettivamente (Himonas e Liakos, 1980) mentre una dose singola di 10 mg/kg per os ha portato a una diminuzione delle cariche parassitarie del 92,22 % (Cordero, 1980). Su 300 pecore è stata testata l'efficacia delle capsule intraruminali a lento rilascio di albendazolo (Proftril-Captec<sup>®</sup>) contro i nematodi gastrointestinali e *D. dendriticum* per il controllo dei conseguenti effetti sulla produttività (formaggio e lana) (Čorba ed al., 1991). Gli animali trattati sono risultati negativi ai test coprologici per 10 settimane dopo la somministrazione delle capsule ed è stato registrato un indice di efficacia del 96,2 e del 99,2% alle necrosopie sui nematodi gastrointestinali (*Nematodirus* spp., *Oesophagostomum* spp., *Cooperia* spp., *Trichostrongylus* spp. e *Trichuris ovis*) e dell'88,5% contro *D. dendriticum*. Inoltre è stato osservato anche un aumento dei livelli di produzione degli animali trattati (2,56 kg di formaggio e 0,6 kg di lana in media rispetto al gruppo di controllo), e una riduzione della contaminazione del pascolo con larve di nematodi. L'efficacia di queste capsule intraruminali è stata poi valutata specificatamente contro gravi infestazioni da *D. dendriticum* ed è stata segnalata una diminuzione significativa delle UPG nel corso delle prime 2 settimane con una riduzione delle cariche parassitarie del fegato del 91,8% (Čorba e Krupicer, 1992). Il triclabendazolo, un altro derivato benzimidazolico, ha dimostrato di essere un fasciolicida molto efficace contro le forme mature e immature del parassita in dosi orali singole di 5 e 10 mg/kg, anche se non è stata riscontrata alcuna efficacia contro la dicroceliosi e la paramfistomosi (Guralp e Tinar, 1983). Una singola dose orale (40 mg/kg) di tiofanato nei bovini, caprini e ovini è risultata efficace contro il *D. dendriticum* soprattutto negli ovini. Il netobimin (un composto nitrofenillunidine) è stato utilizzato per il trattamento della dicroceliosi nelle pecore alla dose di 20 mg/kg (Sanz et al., 1987) e 15 mg/kg (Rojo-Vazquez et al., 1989) con buoni risultati. Secondo Quiroz-Romero et al. (1996) la riduzione massima dell'eliminazione delle uova si ha con il trattamento a novembre e gennaio. Fino ad oggi non sono state studiate strategie di vaccinazione contro la dicroceliosi sebbene sia stata evidenziata una risposta anticorpo-dipendente.

## Profilassi

Il controllo del *Dicrocoelium* spp. è stato difficile e insoddisfacente fino ad oggi a causa della complessità del suo ciclo biologico e della sua epidemiologia. Il controllo si è basato principalmente su pratiche di allevamento (evitare il pascolo nelle prime ore del mattino o la sera tardi per diminuire la probabilità di infestazione in seguito all'ingestione delle formiche), sul controllo di entrambi gli ospiti intermedi, e sul trattamento degli animali.). Come nel caso dei nematodi broncopolmonari e di *F. hepatica* (Cabaret e Galkin-Cabaret, 1985), dovrebbero essere valutate le caratteristiche del suolo per rilevare la presenza di terreno calcareo che rappresenta l'habitat idoneo per lo sviluppo degli ospiti intermedi. I metodi per il controllo degli ospiti intermedi possono essere effettuati solo in piccole aree, a causa dei costi molto elevati. Il controllo degli ospiti intermedi con sostanze chimiche non è facile per motivi ecologici, l'uso di calciocianamide, un fertilizzante molluschiocida, è costoso ed è spesso inattuabile per le condizioni del terreno. In termini pratici, la profilassi nelle aree endemiche si basa sul trattamento strategico di tutti gli animali esposti direttamente (attraverso il pascolo libero) alle infestazioni.

### 2.2. *Fasciola hepatica*

Gli agenti responsabili di fasciolosi sono elminti piatti di grandi dimensioni appartenenti al Genere *Fasciola*, Famiglia Fasciolidae. Le trematodosi epatiche dei ruminanti sono solitamente causate da *F. hepatica*. La fasciolosi epatica si verifica in tutto il mondo, dove le condizioni climatiche e le aree paludose (foto n°5), creano le condizioni ideali per la sopravvivenza di molluschi gasteropodi acquatici, che fungono da ospiti intermedi per questi parassiti.

Il più comune trematode epatico, *F. hepatica*, è stato descritto per la prima volta nel 14° secolo in Francia da Jean de Brie. Anche *Fasciola gigantica* e *Fascioloides magna* sono importanti cause di alterazioni epatiche di origine parassitaria dei ruminanti in alcune parti del mondo. Gli adulti di *F. gigantica* e *F. hepatica* si localizzano nei dotti biliari. Al contrario, gli adulti di *F. magna*, i cui ospiti sono di solito alci e cervi dalla coda bianca, talvolta possono essere riscontrati nel parenchima epatico di ospiti aberranti, ad esempio, pecore. Il primo riscontro registrato di *Fasciola* sugli ovini risale al 1379 da parte di Jean de Brie, un francese

commissionato dal re Carlo V di Francia a scrivere un trattato sulla corretta gestione delle greggi di ovini e la produzione della lana.

Il parassita è stato successivamente menzionato nel 1523 dall'avvocato inglese, Sir Anthony Fitzherbert. La denominazione “fluke” si pensa derivi dalla parola anglosassone “floc”, che significa “passera” (un tipo di pesce).

Nel 1547, Gabucinus, riferì di elminti somiglianti a semi di zucca che spesso ritrovava nel fegato di pecore e capre e Conrad Gesner menzionò i trematodi del fegato nel suo libro, *Historia Animalium* (1551). La prima persona a ricercare e descrivere i trematodi nel fegato fu Francesco Redi nel 1668, che recuperò i parassiti dal fegato di un ariete e qualche anno dopo ritrovò 18 elminti con le stesse caratteristiche nella bile di una lepore. Fino ad oggi, la famiglia Fasciolidae Railliet, 1895 include grandi parassiti, che vivono nel fegato e nelle vie biliari dei ruminanti domestici e selvatici, anche se due generi sono parassiti intestinali e alcune specie possono essere riscontrate negli onnivori e, occasionalmente, nell'uomo.

### **Morfobiologia**

La specie più importante è *F. hepatica*, il più comune trematode epatico, l'agente eziologico della fasciolosi dei ruminanti nelle zone temperate. Gli adulti di *F. hepatica* sono lunghi 2-3,5 cm con una larghezza di 1 cm, a forma di foglia, di colore bruno pallido, con un'estremità anteriore conica, il tegumento è ricoperto da spine sporgenti retrorivolte e per queste caratteristiche si dice comunemente che questo parassita assomigli a una foglia di salvia (foto n°6, 7). Nonostante siano parassiti del fegato, occasionalmente dei trematodi erratici possono essere ritrovati anche in altri organi, ad esempio i polmoni, dove vengono incapsulati.

La parassitosi ha una grande importanza veterinaria, a causa delle enormi perdite economiche negli allevamenti (scarso tasso di crescita, riduzione della produzione latte, effetti negativi sulla qualità e quantità della lana, e interferenza con i parametri riproduttivi). Il trematode adulto si riproduce sessualmente nell'ospite definitivo. Ogni parassita adulto può produrre fino a 2000-2500 uova al giorno (foto n°8), che vengono rilasciate nella cistifellea e espulse con le feci dell'ospite.

Il numero è legato sia all'ospite che a fattori del parassita (un singolo animale può eliminare 2-3.5 milioni di uova al giorno). La recettività dell'ospite varia con la specie, la carica parassitaria e il flusso biliare. Gli animali selvatici possono anche

fungere da serbatoi, ma il loro significato epidemiologico non è sufficientemente chiarito. Ci sono interessanti variazioni stagionali nell'escrezione delle uova, con un aumento durante la primavera e l'autunno. Indipendentemente dalle variazioni dovute ad animali con infestazione cronica (un trematode può vivere fino a 8-11 anni) le uova sono escrete tutto l'anno, la contaminazione del pascolo è costante e le infestazioni massive non sono rare nella pecora.

Le uova eliminate completano il loro sviluppo al di fuori dell'ospite. Subito dopo la schiusa, il miracidio mobile deve penetrare attivamente all'interno di un mollusco gasteropode, dove il parassita si moltiplica asessualmente (sporocisti, redie e cercarie). Le cercarie lasciano il gasteropode e nuotano liberamente fino ad incistarsi formando le metacercarie. Queste vengono ingerite da un ospite vertebrato e si disincistano nel piccolo intestino; le forme giovanili penetrano nella parete intestinale, migrano attraverso la cavità peritoneale e successivamente attraverso il parenchima epatico fino a raggiungere i dotti biliari, dove raggiungono la maturità sessuale. La presenza di *F. hepatica* dipende da fattori che influenzano lo sviluppo dei molluschi gasteropodi ospiti intermedi, in particolare la presenza di habitat adeguati per le limnee e condizioni ambientali idonee, principalmente l'umidità e la temperatura. Per svilupparsi, le uova devono essere separate dalla massa fecale e hanno bisogno di temperature e umidità adeguate (Harris e Charleston, 1976). In queste condizioni, all'interno dell'uovo si sviluppa una larva ciliata (miracidio) e fuoriesce quando la luce stimola la produzione di un enzima proteolitico che indebolisce l'opercolo fotoattivo. L'attività del miracidio e l'ipertonicità all'interno dell'uovo, agiscono sull'opercolo che si apre, permettendo al miracidio di uscire all'esterno. In laboratorio, a 26°C, il processo si completa in 12 giorni, anche se in condizioni di campo richiede diverse settimane (fino a 2 mesi) a 10-12°C. Successivamente nella ricerca del mollusco, sono determinanti gli stimoli chemiotattici che coinvolgono temperatura, pH, ossigeno, salinità, composizione ionica e torbidità dell'acqua. Il principale ospite intermedio di *F. hepatica* è il gasteropode *G. truncatula* che risulta ampiamente distribuito e ha una specificità molto marcata. Il potenziale biotico di questi molluschi è molto elevato, un solo gasteropode infatti è in grado di dare origine a 25.000 nuovi esemplari in circa 12 settimane, se le condizioni ambientali sono favorevoli. L'attività dei molluschi che

sono sopravvissuti in inverno inizia in primavera, anche se le temperature medie giorno/notte aumentano di più di 10°C, se vi è sufficiente umidità possono infatti sopravvivere tutto l'anno. Nelle estati secche e calde dell'altopiano centrale e delle regioni meridionali della penisola iberica, i molluschi diventano inattivi a causa della siccità, ma fonti di irrigazione locali, come lungarni o impianti di irrigazione, consentono la loro sopravvivenza.

Il miracidio penetra all'interno del gasteropode e, se le condizioni ambientali e nutrizionali sono favorevoli, dà origine alle cercarie, la cui quantità risulta estremamente variabile e dipende dal numero di miracidi che infestano la lumaca; si possono sviluppare da 10 a 4000 cercarie (media: 100 cercariae/*Galba*) (Rojo-Vázquez e Ferre-Pérez, 1999). In condizioni naturali, lo sviluppo all'interno del mollusco dura in genere 8-10 settimane. Non tutte le popolazioni di gasteropodi sono in grado di sostenere il completo sviluppo larvale di *F. hepatica*: la mortalità delle lumache, la prevalenza dell'infestazione e il numero di cercarie prodotte sono molto variabili. Le cercarie rilasciate dalle lumache perdono la loro coda, si incistano sulle piante e sulle erbe acquatiche (circa il 10% si comporta meglio in acqua) diventando metacercarie che sono circondate da un rivestimento ruvido (Rojo-Vázquez e Ferre-Pérez, 1999). Queste metacercarie sono molto sensibili alle alte temperature e all'essiccamento, ma possono sopravvivere durante l'inverno.

L'infestazione degli animali ha luogo durante il pascolo, ma è anche probabile che si verifichi attraverso l'acqua potabile o tramite fieno e insilati di cattiva qualità. Non tutte le metacercarie ingerite si impiantano nel fegato, molte vengono perse con le feci o durante migrazioni intraorganiche, con una media di successo del 25-60% (media 40%) (Rojo-Vázquez e Ferre-Pérez, 1999). La capacità di infestazione delle metacercarie è influenzata dalla temperatura ambientale durante lo sviluppo all'interno del mollusco e dalle condizioni climatiche dopo l'incistamento delle cercarie. La massima capacità di infestazione si verifica con temperature di circa 22-23°C (Rojo-Vázquez e Ferre-Pérez, 1999). Le metacercarie perdono il loro rivestimento nel piccolo intestino durante un processo che viene avviato nel rumine grazie a un'elevata concentrazione di anidride carbonica e una temperatura di 39°C, poi continua nel tenue vicino al dotto biliare comune ed è favorita dalla bile e dal

parassita stesso. In seguito i giovani trematodi attraversano la parete intestinale, proseguono nella cavità addominale e raggiungono il fegato.

Circa 4 giorni dopo l'infestazione, iniziano a perforare la capsula di Glisson. In questa fase hanno una forma lanceolata e misurano 1-2 mm; in meno di 2 mesi migrano in tutto il parenchima epatico, stabilendosi definitivamente nei dotti biliari 40 giorni dopo l'infestazione, dove raggiungono l'età adulta. 55-56 giorni dopo l'infestazione, le prime uova compaiono nelle feci degli ospiti definitivi (Rojo-Vázquez e Ferre-Pérez, 1999). Eccezionalmente, i trematodi immaturi possono attraversare il peritoneo viscerale e raggiungere i vasi sanguigni o altri organi (polmone, linfonodi sottocutanei e utero) (Rojo-Vázquez e Ferre-Pérez, 1999).

La conoscenza delle relazioni tra il ciclo vitale e i fattori climatici e geografici ha consentito una migliore comprensione dell'epidemiologia dell'infestazione e dei periodi di rischio (Ollerenshaw e Smith, 1969 e Luzón- Peña et al., 1992). Complessi modelli matematici computerizzati consentono la previsione del rischio di infezione annuale di *F. hepatica* con grande affidabilità (Kantzoura et al., 2011). Probabilmente, i modelli epidemiologici di alcuni paesi del Nord Europa, con due cicli annuali di infestazione e di massimo rischio per gli animali in autunno, sono validi anche in molte aree dei paesi para-mediterranei (Luzón-Peña et al., 1992). In questi cicli annuali prevedibili, la densità massima di metacercarie nell'erba e l'infestazione dei ruminanti si verificano alla fine dell'estate e durante l'autunno e le manifestazioni cliniche possono comparire alla fine dell'autunno e per tutto l'inverno. Gli stadi di *F. hepatica* all'interno del mollusco possono ibernarsi con le lumache, un fatto di grande rilevanza epidemiologica. Queste dinamiche sono più rare in primavera e più frequenti in autunno e in inverno.

Gli studi effettuati nell'Europa occidentale hanno dimostrato che le redie e le cercarie mature possono essere ritrovate tutto l'anno, anche se il periodo da settembre a dicembre è considerato il più favorevole per l'emissione delle cercarie.

La resistenza delle metacercarie alle condizioni ambientali sfavorevoli contribuisce alla contaminazione delle erbe in primavera dopo inverni miti.

La massima eliminazione di uova di *F. hepatica* si attua in inverno e l'infestazione delle pecore si verifica principalmente durante l'autunno. Per tutto l'inverno, nella maggior parte delle regioni temperate del mondo, le condizioni climatiche non



permettono lo sviluppo delle uova e delle lumache (< 10 °C), ma se le metacercarie sono in grado di svernare, gli animali possono essere infestati con quelle originate l'autunno precedente. Il ruolo delle lumache infestate svernanti dipenderà dalla durata della stagione fredda, raggiungendo livelli elevati durante gli inverni miti. Nelle regioni secche, l'elevata temperatura estiva assicura un piccolo rischio di infestazione, che non aumenterà fino all'inizio delle piogge autunnali. Durante la prima metà dell'autunno, quando le temperature miti coincidono con un'elevata piovosità, si creano le condizioni più favorevoli alla trasmissione. Si sono avute diverse interpretazioni in passato sullo svernamento di *F. hepatica*. Nelle zone temperate dei paesi del Nord Europa, alcuni autori hanno evidenziato come lo svernamento delle uova al di fuori (Armour et al., 1970; Urquhart et al., 1970, Bruce et al.; 1973, Ross, 1977; Shaka e Nansen, 1979) o all'interno delle lumache (Ollerenshaw e Smith, 1969) fosse responsabile delle prime emissioni annuali di cercarie.

Lo svernamento dell'infestazione all'interno delle lumache in aree con climi freddi, riportato da Boray (1969) e Pecheur (1967), è stato confutato da Hoover et al. (1984) e Harris e Charleston (1976), ma confermato da Gaasenbeek et al. (1992). Secondo il parere di alcuni autori, le metacercarie possono sopravvivere al congelamento, mentre gli studi di Pecheur (1967) e Hoover e al. (1984) suggeriscono che le metacercarie non svernano bene nei climi freddi.

*F. hepatica* ha la sua origine probabilmente nella regione eurasiatica orientale ed è stata in grado di colonizzare e adattarsi ad un nuovo clima settentrionale e temperato più freddo di *F. gigantica*, potendo infestare quindi due nuovi ospiti: piccole specie di limnee, come *Galba* spp., e ruminanti di medie dimensioni. Di conseguenza, l'origine di *F. hepatica* sarebbe un po' più recente di *F. gigantica*, il che spiegherebbe la sua meno marcata specificità sia per la lumaca ospite intermedio che per l'ospite definitivo.

Le origini comuni delle due specie (*F. hepatica* e *F. gigantica*) e la loro diffusione hanno portato ad una sovrapposizione di questi trematodi in alcune zone, dove le limnee consentono lo sviluppo di entrambe le specie, e la loro bassa specificità nella specie ospite definitivo permette ad entrambe di convivere nel fegato dello stesso animale, spiegando quindi in quelle aree la descrizione genetica di forme ibride.

Le movimentazioni degli ospiti definitivi sono attualmente molto frequenti con il rischio di scambio di parassiti e di diffusione di trematodi e rendono difficile ottenere risultati coerenti in studi genetici con markers molecolari. Fattori simili potrebbero essere applicati all'espansione delle lumache, come sembra essersi verificato per *G. truncatula* che è l'originale specie ospite intermedio più probabile per *F. hepatica* e per specie del gruppo *Radix* per *F. gigantica*.

E' noto il fatto che il clima sta cambiando con una tendenza verso l'aumento delle temperature ed inverni più caldi, più brevi, anche più umidi in climi temperati, come in alcune regioni europee. Alcune previsioni indicano che entro la fine di questo secolo ci potrebbe essere un ulteriore aumento di 4°C, dopo il registrato aumento di 1°C tra il 1961 e il 2004 (Barnett et al., 2006). Alcuni studi indicano che la stagione di crescita delle erbe si è estesa di circa 30 giorni e il numero di giorni di gelo si è ridotto di circa 20 giorni.

Questi cambiamenti influenzano sia le fasi a vita libera che gli ospiti intermedi. Recentemente, Kenyon et al. (2009) hanno descritto l'insorgenza e la tempistica di alcuni focolai di malattie, come la fasciolosi, evidenziando i cambiamenti epidemiologici dell'infestazione legati direttamente ai cambiamenti climatici. Secondo questi autori dall'inizio di questo secolo, la presenza di *F. hepatica* è stata confermata nella maggior parte delle aziende agricole del sud est della Scozia, con una diffusione simultanea dei trematodi da aree del Regno Unito occidentale in cui erano tradizionalmente presenti a distretti orientali normalmente secchi nei quali non si erano mai sviluppati. Questi cambiamenti epidemiologici e la comparsa di popolazioni resistenti ai triclabendazolo stanno creando attualmente uno scenario davvero preoccupante. La longevità dei trematodi adulti e la loro capacità di vivere in diversi ospiti definitivi, fornisce loro un'ulteriore protezione contro gli effetti diretti dei cambiamenti climatici. Sebbene la stagionalità della fasciolosi sia principalmente influenzata dall'effetto della temperatura e dell'umidità sulla popolazione della lumaca ospite, anche altre fasi del ciclo vitale sono potenzialmente interessate da questi cambiamenti, per esempio, la presenza di umidità è necessaria per lo sviluppo delle uova e delle cercarie. Le lumache ospiti intermedi vivono generalmente in zone paludose permanenti, ma possono diffondersi in qualsiasi area nella quale è presente l'acqua, ad esempio le zone allagate, i canali di scolo o le

impronte degli zoccoli. In questo modo, sia i trematodi che le lumache possono sopravvivere meglio con un aumento delle precipitazioni. Per riassumere, il periodo di adeguata umidità e temperatura per lo sviluppo di *F. hepatica* potrebbe estendersi con un importante incremento sulla contaminazione del pascolo. Questa situazione potrebbe portare ad un uso più frequente di trematocidi per il loro controllo e lo sviluppo di popolazioni resistenti (Kenyon et al., 2009). La temperatura ha un effetto diretto sulla moltiplicazione asessuale delle larve, aumentando così il numero totale della produzione di cercarie, e indirettamente sulla trasmissione dell'infestazione. Mediante una semplice formula, è possibile analizzare l'influenza della temperatura sulla trasmissione consentendo la comprensione di altri fattori che agiscono in sinergia con essa (Poulin, 2006).

Alcune attività agricole sono state messe in relazione con alte prevalenze di *F. hepatica*, migliorando le condizioni esterne adatte per il ciclo vitale, come le politiche rurali in zone con irrigazione (Munguía-Zóchihua et al., 2007). Anche la gestione del gregge può svolgere un ruolo importante nella prevalenza di *F. hepatica* in zone a clima temperato, senza grandi variazioni climatiche e ambientali; la falciatura dei campi può rimuovere le metacercarie e le uova o i miracidi schiusi, limitando così l'esposizione alla popolazione esistente di lumache. Inoltre, la durata della stagione di pascolo è direttamente legata all'esposizione alle metacercarie e il tempo di ricovero all'interno può essere particolarmente importante per evitare i periodi di elevato rischio (Bennema et al., 2010).

Il monitoraggio dei tassi di infestazione delle lumache con l'utilizzo di strumenti di biologia molecolare (ad esempio, i metodi basati sulla PCR) è un'alternativa per il controllo della prevalenza dell'infestazione delle lumache e del rischio per gli animali al pascolo (Caron et al, 2011.). Le differenze di suscettibilità della lumaca al clima sono importanti anche dal punto di vista epidemiologico. In questo senso, con un tasso simile di infestazione, la specie di lumaca che si adatta maggiormente alla sopravvivenza in diversi climi presenta un numero maggiore di parassiti. Tuttavia, in seguito a cambiamenti di microhabitat, altre specie possono sopravvivere più facilmente e assumere il ruolo di ospite intermedio in condizioni umide o fredde. La distribuzione di *F. hepatica* in tutto il mondo è senza dubbio correlata con la sua capacità di infestare diversi ospiti, sia definitivi che intermedi.

## Note epidemiologiche

Diverse specie sono cosmopolite, mentre altre hanno una distribuzione relativamente limitata. La sottofamiglia Fasciolinae è caratterizzata da un cieco ramificato e da testicoli dendritici e comprende i seguenti tre generi: *Fascioloides*, con una sola specie, il grande trematode americano del fegato *F. magna*, che infesta bovidi e cervidi nord americani ed europei; il genere *Tenuifasciola*, proposto da Yamaguti (1971) per *Fasciola fragelaphi* trovato nei dotti biliari dell'antilope *Tragelaphus spekei* in Zimbabwe (Pike e Condy, 1966) e poi successivamente anche nei bovini (Mukaratirwa e Brand, 1999) e, infine, il genere *Fasciola* che comprende quattro specie considerate attuali (Yamaguti, 1971), fra le quali le più importanti sono *F. hepatica* e *F. gigantica*.

*F. hepatica* si ritrova nei dotti biliari e nella cistifellea dei ruminanti domestici, in particolare pecore, capre e bovini, ma anche in altri animali domestici (ad esempio equini, suini, camelidi) e selvatici (ad esempio cervi, conigli, lepri, lontre). E' distribuita soprattutto nelle zone temperate e subtropicali dell'Europa, delle Americhe, in Asia e in Africa (Pantelouris, 1965; Boray, 1982; Mas-Coma e Bargues, 1997). *F. gigantica* (il trematode epatico tropicale) è un comune parassita dei dotti biliari e della cistifellea degli erbivori domestici (ovini, caprini, bovini, bufali, cammelli, maiali, cavalli e asini) e selvatici (grandi antilopi, cervi, giraffe e zebre) nelle zone tropicali e subtropicali dell'Africa e dell'Asia.

E' stata anche riportata occasionalmente in lontre e scimmie. *F. nyanzae* è stata riscontrata nei dotti biliari dell'*Hippopotamus amphibius* e *F. jacksoni* nel fegato degli elefanti asiatici. La differenziazione tra *F. hepatica* e *F. gigantica* è basata sui caratteri morfologici, nonostante sia difficile discernere con esattezza tra gli isolati delle due specie a causa della loro variabilità (Kendall, 1965), e per la presenza di forme intermedie di *Fasciola* scarsamente caratterizzate (Itagaki et al., 2009; Ichikawa e Itagaki, 2010).

Inoltre la fasciolosi è una zoonosi emergente negli esseri umani (Mas-Coma et al., 2005).

L'identificazione delle differenti specie è molto importante in alcune zone, come nella Penisola iberica che a causa della sua particolare localizzazione geografica

nella parte occidentale dell'Eurasia, rappresenta un “cul de sac” delle migrazioni da est a ovest oltre ad essere un refugia climatico durante le glaciazioni.

La differenziazione tra l'infestazione da *F. hepatica* e *F. gigantica* è molto importante, a causa delle loro diverse modalità di trasmissione e caratteristiche epidemiologiche. Come accennato in precedenza, *F. hepatica* è diffusa in tutto il mondo, mentre *F. gigantica* si trova solo in molte aree dell'Africa e dell'Asia. Questa sovrapposizione geografica dà luogo a molti problemi nell'individuare l'agente eziologico di una malattia. Nonostante le due specie possano essere identificate generalmente in base alla loro morfologia (Ashrafi et al., 2006), non è facile distinguerle con precisione perché agli estremi della gamma delle dimensioni, gli esemplari di una specie sono molto simili all'altra, senza considerare la presenza di forme intermedie, differenziabili soltanto tramite l'uso di tecniche molecolari e markers (Marcilla et al., 2002). Inoltre, recenti studi sperimentali e sul campo hanno rivelato che la specie degli ospiti definitivi influenza decisamente i valori morfometrici dei trematodi epatici adulti e delle uova. L'unica recente indagine effettuata in Sardegna è stata condotta su 66 campioni ovini e bovini identificati morfologicamente come appartenenti a *F. hepatica*; le sequenze dei geni ITS, *cox 1* e *Nadh* sono state confrontate con quelle presenti in *Genebank*; questo ha mostrato uniformità genetica con i genotipi del Sud-Europa, e un'uniformità del 100% tra i campioni ovini e bovini esaminati (Farjallah et al., 2013). In Spagna sono state riportate variazioni intraspecifiche in *F. hepatica* da Vara del Rio et al. (2007a) nello studio di isolati appartenenti ad allevamenti ovini della provincia di León (NW Spagna), che avevano mostrato differenti risposte agli antelmintici albendazolo, triclabendazolo e clorsulon.

Recenti pubblicazioni riportano che i modelli epidemiologici stanno cambiando con un aumento della prevalenza nei paesi dell'Europa settentrionale (Daniel e Mitchell, 2002), fatto che indica che le metacercarie sono presenti sul pascolo durante l'inverno, di conseguenza gli animali sono esposti al contagio per lunghi periodi. Questa situazione è ben nota nelle regioni del sud-Europa da alcuni decenni. Per esempio, in Spagna, l'infestazione delle lumache può verificarsi tutto l'anno, con un tasso più alto a fine estate-autunno e alla fine dell'inverno, l'emissione di cercarie più alta viene registrata in autunno, mentre le pecore eliminano le uova durante tutto

l'anno (Manga et al., 1990). Tuttavia, in queste zone il contributo dello svernamento delle uova autunnali all'infestazione della lumaca è trascurabile, se confrontato con le uova escrete dalla metà dell'inverno in poi (Luzón-Peña et al., 1992). Inverni miti permettono lo svernamento di lumache che sono responsabili della contaminazione da parte delle cercarie in primavera e, probabilmente, una situazione simile si verifica attualmente nel nord Europa a causa dei mesi invernali più miti. Tuttavia, lo svernamento delle metacercarie sembra essere meno importante in Spagna e altri paesi mediterranei (Luzón-Peña et al., 1994) rispetto ai paesi del Nord (Shaka e Nansen, 1979).

Negli ultimi decenni, sono stati registrati diversi casi di *F. hepatica* in Europa (Torgerson e Claxton, 1999). In Italia, in un'indagine condotta da Cringoli et al. (2002) su aziende bovine e ovine in Campania, Puglia e Basilicata, è stata riscontrata una positività dell'11,1% a *F. hepatica* e del 53,1% a *D. dendriticum* nelle aziende bovine e del 4,1% a *F. hepatica* e del 67,5% delle aziende ovine positive a *D. dendriticum*. Un altro studio effettuato in provincia di Trento sui bovini ha riportato casi di positività del 17,1% a *F. hepatica* e del 16,2% a *D. dendriticum*. Nonostante i ruminanti rappresentino le specie ospiti, i maiali o i cavalli sono considerati ospiti secondari, e altri mammiferi selvatici, come le lepri, sono stati recentemente inclusi come parte dei refugia di questo trematode (Walker et al., 2010). Questo riemergere potrebbe essere dovuto a molti fattori quali modifiche delle condizioni di sviluppo delle fasi esogene a causa dei cambiamenti climatici, alla maggiore esposizione parassita-ospite come avviene in aziende biologiche dove gli animali pascolano tutto l'anno o all'uso massiccio di farmaci che aumentano la presenza di popolazioni antelmintico resistenti che se si diffondessero potrebbero essere fonte di grande preoccupazione. D'altra parte, è difficile stimare con precisione l'impatto economico del riemergere della fasciolosi. Le perdite dirette derivanti da morte o alterazioni epatiche sono molto importanti, ma l'aumento della frequenza di casi subclinici rende le perdite indirette ancora più importanti anche se difficilmente quantificabili.

### **Sintomatologia e lesioni**

Le caratteristiche cliniche e le lesioni causate da *F. hepatica* sono legate alle specie ospiti, al numero di metacercarie ingerite, alla durata dell'infestazione, allo stato nutrizionale e alle richieste metaboliche, ad esempio in gravidanza avanzata. I danni

che si originano nell'ospite sono dati da cause meccaniche e chimiche e dalla risposta infiammatoria ed immunitaria dello stesso. Gli effetti meccanici sono dati dalla migrazione attraverso il fegato degli stadi giovanili muniti di spine nel tegumento e dagli enzimi proteolitici secreti dal parassita. Alcuni prodotti chimici, come le catepsine, svolgono un ruolo importante nella patogenesi dell'infestazione.

Questa è associata ad una forte risposta Th2, che a sua volta è collegata con la produzione di citochine. La severità dell'infestazione può essere ridotta negli animali con esposizione precedente al parassita, nei quali si ha una diminuzione della dimensione degli elminti e della produzione di uova, un'anemia che si sviluppa più tardi, una crescita più rapida del numero di eosinofili e un'infiltrazione linfocitaria del fegato.

Un aspetto interessante di *F. gigantica* è la diversa risposta all'infestazione in differenti razze ovine, come è stato osservato nelle pecore indonesiane dalla coda sottile (Piedrafita et al., 2004; Pleasance et al., 2011). D'altra parte, in *F. hepatica*, i meccanismi immunologici coinvolti sono apparentemente inefficaci, a dimostrazione che la resistenza è determinata dalle differenze biochimiche tra le due *Fasciola* spp. Molti dei primi studi su *F. gigantica* e *F. hepatica* ipotizzavano che le due infestazioni fossero essenzialmente simili. Tuttavia, *F. hepatica* si sviluppa più rapidamente di *F. gigantica*, con un conseguente aumento dei livelli plasmatici di GLDH, indice di un danno maggiore al parenchima epatico (Boyd, 1962 e Meeusen et al., 1995) e un aumento dei livelli di GGT a 10 settimane dall'infestazione, indicando il danno epiteliale nei dotti biliari (Chauvin et al. 1995; Martínez-Valladares et al., 2010b). Il danno più grave sulle pecore infestate da *F. hepatica* era evidenziato anche dai maggiori scoring soggettivi delle lesioni epatiche e dall'ipertrofia compensativa del fegato, con un conseguente aumento significativo del peso relativo del fegato e la diminuzione dei livelli di emoglobina 9 settimane dopo l'infestazione. La risposta eosinofila a seguito dell'infestazione da *F. hepatica* è bifasica, con un picco iniziale a 4 settimane (fase migratoria) e un secondo picco a 9 settimane dall'infestazione e un aumento dei livelli di GGT dopo 10 settimane (danno epiteliale ai dotti biliari). Alcuni autori hanno dimostrato che gravi infestazioni sia da *F. gigantica* che da *F. hepatica* potevano indurre effetti simili sulle produzioni, nonostante il maggior danno da parte di *F. hepatica*, suggerendo che le perdite di

produzione sono legate non solo alla biomassa del trematode e alle alterazioni epatiche; piuttosto, c'è una soglia oltre la quale le perdite di produzione da parte di *F. gigantica* e *F. hepatica* sono paragonabili.

Le proteasi sono essenziali per sostenere il parassita anche nella digestione dei componenti dell'ospite, facilitando la migrazione e l'alimentazione del parassita e l'evasione dalla risposta immunitaria. Proteasi omologhe degli elminti includono delle catepsine L, B e C (Robinson et al., 2008). Alcune catepsine Bs sono state identificate nelle metacercarie, nelle forme giovani appena disincistate o nei trematodi immaturi di *F. hepatica* (Cancela et al., 2010). Robinson et al. (2009) identificarono 7 ulteriori sequenze di catepsina B negli stadi giovanili, nelle forme immature e negli adulti di *F. hepatica*, delle quali 6 sono espresse nei parassiti giovani/immaturo invasivi, suggerendo un ruolo importante nelle fasi di invasione e impianto da parte del parassita. Tra tutte le catepsine, solo due sequenze di catepsina B sono espresse sia negli stadi giovanili che adulte di *F. hepatica*, suggerendo che queste due proteasi potrebbero svolgere un ruolo unico nella biologia del trematode (Robinson et al., 2009). Le proteasi catepsina B sono importanti per la sopravvivenza: in vitro, intervengono nel passaggio attraverso la parete intestinale delle forme giovanili di *F. hepatica* appena disincistate (McGonigle et al., 2008) e vengono rilasciate nei tessuti dell'ospite subito dopo l'infestazione, sono altamente antigeniche durante l'infestazione in vivo e sono resistenti alle cistatine inibenti dell'ospite (Beckham et al., 2009).

Il quadro clinico di fasciolosi è molto variabile e dipende dalla specie dell'elminta, dalla dose infestante, dalla risposta immunitaria dell'ospite e dalla fase e dalla durata dell'infestazione (Boray, 1969; Haroun e Hillyer, 1986; Torgerson e Claxton, 1998; Piedrafita et al., 2004).

La fasciolosi è caratterizzata da due forme principali: acuta, solitamente caratterizzata da dolore addominale, perdita di peso, anemia, epatomegalia e/o febbre ed è il risultato del danno tissutale causato dalla migrazione degli elminti immaturi attraverso la parete duodenale, e successivamente nella capsula e nel parenchima epatico, e l'infestazione cronica, che si sviluppa una volta che i trematodi adulti si sono stabiliti all'interno dei dotti biliari, dove inducono colangite, iperplasia dell'epitelio e fibrosi dei dotti (Behm e Sangster, 1999 e Marcos et al., 2008). Vi è



anche una fasciolosi subacuta che assume comunque grande importanza. Tuttavia, la tradizionale divisione in fasciolosi acuta, subacuta e cronica è, in pratica, un po' "accademica", perché diversi fattori influenzano il quadro clinico dell'infestazione. La fasciolosi acuta non è comune, ma si verifica talvolta nelle pecore. Gli animali con fasciolosi acuta molto spesso non mostrano segni clinici e vengono trovati morti, talvolta apparentemente in buone condizioni. Questo di solito si verifica durante l'autunno e l'inizio dell'inverno. Le forme acute e subacute di fasciolosi si sviluppano in 2-3 settimane dopo l'infestazione in massa in un breve periodo di tempo di un gran numero di metacercarie, con una conseguente invasione massiccia del parenchima epatico ed un'emorragia dovuta alla migrazione da parte dei giovani trematodi; i segni includono anoressia, dolore addominale, congiuntive giallognole e/o pallide, perdita di peso e morte improvvisa.

In molte regioni, questa forma di solito si presenta da novembre (alcune volte già a settembre) a gennaio. Le migrazioni vengono sostituite in caso di guarigione da tessuto cicatriziale. Forti infestazioni da parte di trematodi immaturi possono causare la morte nella fase di epatite acuta. Un'accurata osservazione del gregge permette l'identificazione di alcuni animali con mucose pallide, letargici, dispnoici durante gli spostamenti, e l'ingrossamento del fegato rilevabile alla palpazione dell'addome e ascite. Gli unici mezzi diagnostici sono l'esame post mortem, gli esami parassitologici e del sangue. Questa forma è spesso complicata dall'infezione simultanea con *Clostridium oedematiens* B responsabile della "Black disease".

La fasciolosi subacuta si verifica dopo 6-10 settimane dall'ingestione di dosi minori di metacercarie per un periodo di tempo più lungo e riflette i danni epatici provocati dalla migrazione dei trematodi ancora immaturi e anche dai trematodi adulti nei dotti biliari dove provocano colangite e si presenta anche nel tardo l'autunno e nell'inverno. Non è così rapidamente fatale come la forma acuta, per cui molti animali del gregge mostrano segni clinici 1-2 settimane prima della morte, come ad esempio malassorbimento, letargia e perdita di peso. Alla visita gli animali mostrano mucose anemiche e ingrossamento palpabile del fegato. Gli elevati livelli degli enzimi sierici glutammato deidrogenasi e  $\gamma$ -glutamyl transpeptidasi indicano il danno al parenchima epatico e alle vie biliari causato dalle migrazioni. Inoltre col protrarsi dell'infestazione, l'anemia potrebbe essere rivelata da un abbassamento

dell'ematocrito. La fasciolosi cronica è la forma più comune e si presenta nel tardo inverno e all'inizio della primavera; può verificarsi durante tutto l'anno a 4-5 mesi dall'ingestione di un basso/moderato numero di metacercarie, ma soprattutto durante l'autunno e l'inverno. Si presenta in modo più grave negli animali denutriti o quando le richieste nutrizionali sono più elevate, come in gravidanza o in allattamento e esita in una progressiva perdita di peso. I sintomi principali sono anemia e ipoalbuminemia, che può provocare dimagrimento, pallore delle mucose, edema sottomandibolare (mascella a bottiglia) e ascite. Le perdite di produzione possono essere economicamente significative, anche in caso di infestazioni relativamente scarse. Pecore naturalmente infette possono presentare un numero ridotto di globuli rossi e un aumento dei leucociti. La  $\gamma$ -glutamyl transpeptidasi è superiore rispetto ai valori di riferimento e rimane elevata anche per quattro settimane nonostante il trattamento antielmintico (Martínez-Valladares et al., 2010).

Nel bovino le fascioliasi presentano normalmente decorso cronico. In questo caso dopo la prima invasione soltanto il 30% delle metacercarie raggiunge le vie biliari e una piccola parte è trattenuta nel parenchima epatico. Lungo i tragitti perforati si instaurano estese aree di necrosi di coagulazione delle cellule epatiche (Rahko T., 1969). Raggiunte le vie biliari, soprattutto del lobo sinistro, i parassiti inducono delle reazioni fibrose e dopo la 16° settimana, calcificazioni tipiche delle pareti dei dotti biliari. Tale stato di fibrosi e calcificazione peggiora le condizioni di vita del trematode e impedisce il perdurare dell'infestazione. In seguito alla morte dei parassiti, anche in seguito ad intervento terapeutico, le calcificazioni vengono eliminate. Contemporaneamente si ha una rigenerazione del tessuto connettivo e un rinnovamento del tessuto epiteliale che può portare addirittura alla restituito ad integrum (Keck G. e Supperer R., 1967). In questo caso i sintomi sono: diarrea, ittero, anemia, dimagrimento ed edema nelle regioni del collo e del petto. Bovini all'ingrasso pesano in genere il 10% in meno rispetto ad altri esenti da distomi, allevati nelle stesse condizioni. Bovine leggermente infestate diedero nel secondo periodo di lattazione 450 kg/anno di latte in più rispetto a vacche fortemente infestate (Koopman J.J., 1968). Oltre a queste forme la fasciolosi di solito si presenta in forma subclinica difficile da diagnosticare, e quindi può essere causa di perdite economiche, solitamente il sintomo più frequente è la diminuzione dell'appetito

(Boray 1969, Sinclair, 1972, Hawkins e Morris, 1978 e Sykes et al., 1980a), con conseguente riduzione dell'assunzione di cibo giornaliera (Dargie, 1987). Non sono stati condotti molti studi per valutare le variazioni dell'assunzione di cibo e di acqua negli animali infestati. La gravità dell'anoressia è stata associata con l'intensità dell'infestazione, ma non vi è alcuna chiara relazione tra la carica parassitaria e la diminuzione dell'appetito (Symons, 1985; Dargie, 1987); tuttavia nel caso di agnelli infestati con un minimo di 20 trematodi, è stata osservata una notevole diminuzione volontaria dell'assunzione di cibo (Ferre et al., 1994).

La mancanza di appetito è stata associata con l'arrivo dei trematodi nei dotti biliari, dato che si manifesta soltanto durante le prime fasi nelle forme acute severe (Dargie, 1987). Tuttavia, Ferre et al. (1994, 1995) hanno osservato che la diminuzione dell'appetito si presenta in contemporanea con l'alterazione della funzionalità epatica, come confermato dall'aumento della concentrazione degli acidi biliari nel plasma e dalla riduzione del flusso biliare e della secrezione degli acidi biliari, ed è stata attribuita al danno epatico che porta a una depressione del metabolismo degli acidi grassi a catena corta in glucosio e all'aumento dei livelli di propionato, che alla fine potrebbe portare ad una riduzione dell'assunzione di cibo volontaria (Anil e Forbes, 1980). Nelle fasciolosi subcliniche sperimentalmente indotte, è noto da tempo che la funzione di alcuni sistemi farmaco-metabolizzanti epatici risultano significativamente alterati negli agnelli (Galtier et al., 1986), negli ovini (Elsheikh et al., 1992). Il sistema citocromo P-450-dipendente mono-ossigenasi, che catalizza l'ossidazione di una varietà di farmaci e xenobiotici, è compromesso negli agnelli (Galtier et al., 1986).

L'iperimmunoglobulinemia specifica è una caratteristica comune nei casi di fasciolosi (Nansen et al., 1975). A partire da 2 settimane, i titoli delle IgG e IgA anti-*F. hepatica* nel siero aumentano raggiungendo valori massimi a 8 settimane dall'infestazione e diminuiscono lentamente in seguito (i livelli delle IgA erano più bassi rispetto a quelli delle IgG). I titoli delle IgG e IgA specifiche nella bile seguono un andamento simile alle immunoglobuline sieriche, ma raggiungono valori massimi a 14 settimane dall'infestazione (Ferre et al., 1997).

Tuttavia, i livelli di immunoglobuline specifiche biliari erano notevolmente inferiori rispetto ai titoli sierici durante l'intero periodo sperimentale.

Il calcolo del rapporto IgG/IgA ha evidenziato che la proporzione di IgA rispetto alle IgG era leggermente superiore nella bile rispetto al siero. I glucani immunomodulatori hanno vari effetti immunofarmacologici, come la stimolazione delle cellule immunocompetenti, l'attività anticorpale ecc e sono anche stati utilizzati nel trattamento di alcune infestazioni da elminti. Di rilievo è l'aumento dell'immunità dell'ospite con un conseguente aumento della sua resistenza. Inoltre, gli immunomodulatori possono anche potenziare una reazione immunitaria locale che è in grado di proteggere gli animali dalla re-infestazione al pascolo. Le lesioni più importanti prodotte da *F. hepatica* si verificano nel fegato. Solitamente, non ci sono reazioni evidenti al passaggio degli stadi giovanili attraverso la parete intestinale e la cavità peritoneale, soltanto piccole lesioni emorragiche sul peritoneo, dove i trematodi si attaccano temporaneamente.

Si verifica una peritonite nelle infestazioni gravi e ripetute, che a volte possono osservarsi nelle pecore. La peritonite può essere acuta e essudativa o cronica e proliferativa. Di solito si sviluppa nella capsula epatica, specialmente nella superficie viscerale, ma può localizzarsi sul peritoneo parietale o viscerale, e nel mesentere.

Nei casi acuti, possono formarsi dei depositi fibrinoemorragici sulle superfici sierose e, nei casi cronici, dei lembi fibrosi con aderenze. Nei depositi di fibrina microscopicamente si possono osservare molti giovani trematodi; negli ispessimenti peritoneali diffusi, si creano delle tortuose gallerie di migrazione contenenti sangue, detriti e giovani parassiti. Nei casi con interessamento del peritoneo viscerale, i giovani trematodi possono essere trovati negli ingrossamenti dei linfonodi mesenterici. Le lesioni acute del fegato causate dai trematodi erranti sono fondamentalmente di natura traumatica, ma ci sono anche delle aree di necrosi, che forse sono in relazione con le escrezioni tossiche dei trematodi. I percorsi migratori sono tortuose gallerie che appaiono come focolai emorragici di 2-3 mm di diametro, nei quali si possono trovare forme giovanili inferiori a 1 mm. In caso di gravi infestazioni il fegato può presentare striature scure e focolai emorragici (foto n°9, 10). Vecchie gallerie da cui i detriti sono stati eliminati appaiono come striature giallo chiare, a causa dell'infiltrazione di eosinofili. I tunnel di nuova formazione sono pieni di sangue e epatociti degenerati e sono infiltrati da eosinofili. In seguito, istiociti e cellule giganti si dispongono attorno ai detriti e li rimuovono, quindi la

guarigione avviene per lo sviluppo di un tessuto di granulazione ricco di linfociti ed eosinofili. In infestazioni massive, le cicatrici possono fondersi tra loro e con aree portali per produrre una fibrosi irregolare moderata. Probabilmente, la maggior parte dei giovani trematodi raggiungono i dotti biliari, ma alcuni si incistano nel parenchima. Le cisti sono più frequenti si trovano sulla superficie viscerale, in seguito possono andare incontro a caseificazione e mineralizzazione o essere obliterate da tessuto fibroso.

L'infestazione da parte di un gran numero di trematodi immaturi può causare la morte in fase di epatite acuta, questo non è frequente ma talvolta può verificarsi nelle pecore. La morte può verificarsi improvvisamente o dopo pochi giorni di febbre, spossatezza e inappetenza, questa è anche la fase in cui può svilupparsi la "black disease". La presenza di trematodi maturi nei dotti biliari più grandi può dare luogo a colangioepatite, solitamente più grave nel lobo sinistro (foto n°11). Alcuni fattori coinvolti nella patogenicità sono l'irritazione meccanica esercitata dalle ventose e dalle spine, l'ostruzione dei dotti, un certo grado di ritenzione biliare e la predisposizione alle infezioni batteriche. Le alterazioni biliari colpiscono più severamente la parte sinistra del fegato e i lobi destri possono essere moderatamente ipertrofici. Anche se le lesioni sono più evidenti nei dotti di dimensioni sufficienti a contenere il parassita, con il tempo e le infestazioni gravi o ripetute, le lesioni si sviluppano anche a carico delle unità portali più piccole, a causa dell'irritazione diretta da parte dei trematodi e della stasi biliare. Il tessuto connettivo e i dotti biliari si uniscono tra loro e con le cicatrici rimaste dalla fase migratoria, in questo modo la fibrosi infiammatoria può obliterare il parenchima in molti punti. Lesioni di minore gravità sono associate con infestazioni leggere di breve durata. Esse possono manifestarsi con locali dilatazioni dei dotti che possono anche non essere immediatamente evidenti. In tali infestazioni lievi, il parassitismo passato o presente può essere evidenziato solo dalla rilevazione dei caratteristici pigmenti ferro-porfirina neri, grossolanamente visibili nei linfonodi (foto n°12).

## **Diagnosi**

Come è stato detto, a volte gli animali affetti da fasciolosi non mostrano segni clinici specifici, in altre occasioni i sintomi sono presenti anche quando l'infezione è dovuta a un'altra malattia o parassitaria o infettiva e tante altre volte la fasciolosi è

subclinica. Come risultato, l'assenza di sintomi specifici rende difficile una diagnosi immediata e corretta. Tuttavia, la diagnosi di fasciolosi può essere effettuata combinando e analizzando e osservando i segni clinici, i parametri del sangue, i test enzimatici, le analisi coprologiche e con l'esame post-mortem del fegato. La diagnosi di fasciolosi con l'osservazione dei segni clinici può provocare tassi di rilevamento bassi fino al verificarsi di alcuni decessi. Nella forma acuta di fasciolosi, in un gregge al pascolo in aree endemiche, soprattutto durante la tarda estate e in autunno, è rilevante il verificarsi di morti improvvise negli ovini precedentemente in buona salute. L'esame degli altri animali del gregge rivela letargia, ridotta attività di pascolamento e riluttanza al movimento. La conferma dell'infestazione può essere fatta solo con la necropsia degli animali morti di recente o delle pecore gravemente colpite. Lo stesso vale per la fasciolosi subacuta, per l'assenza di segni clinici nonostante le lesioni epatiche. Le pecore interessate presentano condizioni fisiche e vello scadenti, e una marcata anemia. In seguito ai danni epatici, le pecore sono depresse, deboli, con riduzione dell'appetito, difficoltà a rimanere in stazione e dolore alla palpazione dell'addome. La fasciolosi cronica può verificarsi praticamente in qualsiasi momento dell'anno, ma più spesso durante l'inverno e la primavera ed è caratterizzata da una progressiva perdita di peso, cachessia e edemi in alcune parti del corpo, in particolare nell'addome e nella regione sottomandibolare, che dà l'immagine tipica chiamata "mascella a bottiglia". Inoltre è presente anemia con mucose pallide e alcuni decessi si verificano soprattutto in animali in gravidanza o allattamento. In queste circostanze, la diagnosi si effettua con l'esame delle feci (Reid, 1973). Nel bovino infestazioni intense provocano, specialmente nei giovani animali, impegnati nel primo periodo di pascolo, delle alterazioni patologiche acute con febbre, notevole dimagrimento e a volte esiti mortali, già 6-7 settimane dopo l'uscita dai pascoli (Boch e Supperer, 1980). Tuttavia, dal punto di vista clinico, le tecniche radiografiche non invasive sono preziose per la diagnosi delle lesioni epatiche (Richter e al., 1999).

Durante le prime fasi della malattia, 7-8 settimane dopo l'infestazione, l'esame ecografico rivela una forte reazione causata dalla migrazione dei trematodi con essudato peritoneale e aderenze fibrinose tra il fegato e la parete del corpo, possono essere rilevate delle aree iperecogene, date dalla deposizione di fibrina nel

parenchima epatico, la parete duttale raggiunge uno spessore notevole 9-10 settimane dopo l'infestazione e l'ecografia mostra forme ecogene sui dotti biliari dilatati.

Questi raggiungono una dimensione massima e tortuosa a partire da 12 settimane, che si evidenziano vicino alla cistifellea. Durante le prime settimane post-infestazione mediante tomografia computerizzata, si osservano lesioni parenchimali e nodulari nella capsula epatica, 5-6 settimane dopo diventano lesioni tortuose e regrediscono 7-8 settimane dopo. L'ecografia è utile per evidenziare nelle pecore aree con ascessi e necrosi causate da un numero elevato di trematodi in migrazione (Gonzal-Orden et al., 2003). I livelli di alcuni enzimi epatici sono utili per la diagnosi, ma il loro valore dipende dalla sensibilità, specificità e stabilità nel plasma (Rowlands e Clampitt, 1979). Nella forma subacuta di fasciolosi, vi è un aumento delle concentrazioni di enzimi epatici, di proteine sieriche alterate e aumento di peso del fegato fino a 15 kg in 40 settimane (Sykes et al., 1980b). I campioni di sangue rivelano elevate concentrazioni di aspartato aminotransferasi, glutammato deidrogenasi e  $\gamma$ -glutamilttransferasi. Vi è una marcata ipoalbuminemia (15 g/L) e iperglobulinemia (68 g/L). L'incremento della glutammato deidrogenasi è indicativo del danno epatico da trematodi migranti, mentre quando i parassiti raggiungono i dotti biliari l'attività dell'enzima epiteliale biliare  $\gamma$ -glutamilttransferasi è al suo livello massimo.

Di conseguenza, in mancanza di altri parametri disponibili, l'aumento di questi due enzimi è indicativo di fasciolosi acuta e subacuto/cronica, rispettivamente.

Nel bovino, nelle prime infestazioni di lieve entità, durante la fase di migrazione, si riscontra soltanto eosinofilia di medio grado. Non prima della settima settimana, poco prima della comparsa nei dotti biliari, si osserva un chiaro aumento dei livelli sierici degli enzimi epato-specifici deidrogenasi sierica (SDH) e deidrogenasi glutammica sierica (GLDH) (Boch e Supperer, 1980). Diversi autori indicano che la fasciolosi provoca inappetenza (Ferre et al., 1994). Infestando pecore con una dose singola di 1000 metacercarie (Dargie et al., 1979) si è verificata una diminuzione della dose giornaliera di fieno (fino al 50%) da 9 a 12 settimane dopo l'infestazione e una leggera diminuzione del peso corporeo. Infestazioni con un dosaggio più basso di 200 metacercarie (Sykes et al. 1980a) hanno causato una riduzione dell'apporto alimentare complessivo del 15% rispetto ai controlli, con una diminuzione

dell'assunzione di alimento a partire da 5-20 settimane dall'infestazione. La ricerca delle uova nelle feci è il metodo migliore per sapere con sicurezza se un ospite alberga i parassiti, ma ha un valore limitato in animali infestati da poco. Nella forma acuta di fasciolosi, gli esami fecali sono negativi e possono anche esserlo anche nelle infezioni subacute, mentre la ricerca di uova nelle feci è un prezioso metodo diagnostico in caso di fasciolosi cronica. Possono essere utilizzate diverse tecniche: semplici analisi dirette delle feci o sofisticati test quantitativi che cercano di concentrare le uova di un campione fecale mediante tecniche di sedimentazione o flottazione. Le metodiche di flottazione utilizzano soluzioni ad alta densità, come il solfato di zinco che permettono alle uova di galleggiare, ma le coartano. La sedimentazione è l'analisi consigliata e l'osservazione delle uova al microscopio è facilitata se si aggiunge una goccia di blu di metilene al concentrato, ed esse si presentano di colore giallastro.

Nell'ovino un'infestazione può essere considerata seria quando il numero delle UPG va dalle 80 alle 150, grave dalle 200 alle 500 UPG, oltre 500 molto grave .

Nei bovini, una media di 50-60 UPG è già indice di rischio zootecnico (Ambrosi, 1995). Il numero di uova diminuisce con l'aumento dell'intensità dell'infestazione ma questo meccanismo si blocca oltre un dato livello di infestazione. La tecnica più comunemente usata per l'immunodiagnosi di fasciolosi è un test ELISA con antigeni secretori/escretori per la rilevazione di anticorpi. L'uso della biologia molecolare negli animali infestati sperimentalmente, è di grande valore per la diagnosi precoce e per la verifica dell'efficacia/fallimento degli antelmintici. Durante il periodo di prepatenza il rilevamento di *F. hepatica* può essere effettuato mediante un ELISA sandwich che ne permette l'identificazione prima che avvenga l'escrezione delle uova, ma hanno una certa utilità anche gli studi epidemiologici (Sánchez-Andrade et al., 2000). In commercio sono disponibili alcuni test per la diagnosi di fasciolosi durante il periodo di prepatenza mediante la rilevazione dei coproantigeni, efficaci già 5 settimane dopo l'infestazione.

La sopravvivenza dei trematodi per un breve periodo dopo il trattamento è una possibile spiegazione per giustificare i risultati di Flanagan (2010), in quanto frammenti di parassita possono ancora essere presenti al 21° giorno dal trattamento con una conseguente positività.



La fasciolosi acuta può essere confermata solo dalla necropsopia. Gli animali colpiti mostrano una fibrosi epatica focale, ingrossamento del fegato con tracce emorragiche e numerosi parassiti in diversi stadi di sviluppo in tutto il parenchima epatico (Murray e Rushton, 1975). Sporadicamente, i parassiti possono trovarsi anche nel peritoneo e, meno comunemente nella milza, nel pancreas e nei polmoni. L'autopsia può evidenziare gravi danni epatici e diffuse aderenze tra fegato, parete addominale, diaframma e intestino tenue e la presenza di trematodi immaturi nel fegato. La forma subacuta è caratterizzata da ipertrofia del fegato e dei vasi sanguigni e da un gran numero di trematodi (500-1500), giovani e adulti. Il fegato mostra fibrosi irregolare che si estende dalla capsula fino al parenchima, con dotti biliari prominenti e ascessi multifocali (Scott et al., 2005).

Animali affetti da fasciolosi cronica mostrano un deterioramento della carcassa, colangite, occlusione biliare e fibrosi epatica, e un numero medio di parassiti attorno a 200, la maggior parte dei quali si trova nei dotti biliari. Oltre al fegato possono essere danneggiati altri organi, come i linfonodi mesenterici e periportalari che sono notevolmente ingranditi e presentano un colore brunastro. Nella diagnosi definitiva bisogna considerare altri disturbi con sintomatologia simile. Per esempio, la fasciolosi acuta dovrebbe essere differenziata dalle malattie clostridiali, dalla pasteurellosi e altre malattie setticemiche, intossicazione e acidosi metabolica. Nella forma cronica bisogna invece considerare le carenze di cobalto e rame, la cattiva alimentazione, e altre infestazioni da elminti, ad esempio da nematodi gastrointestinali (emoncosi), paratubercolosi, scrapie e altre condizioni di deperimento cronico.

### **Trattamento**

Il numero di antielmintici disponibili per il trattamento di fasciolosi è attualmente limitato. La maggior parte dei trematocidi sono efficaci contro i trematodi adulti, ma la loro attività contro gli stadi immaturi è variabile. E' quindi molto importante verificare l'efficacia dei prodotti prima di trattare gli animali, in particolare quando predominano gli stadi immaturi. Nella prima metà del 20° secolo, erano disponibili pochi farmaci e la maggior parte di questi, come il tetracloruro di carbonio e l'esacloroetano erano dotati di scarsa efficacia ed elevata tossicità. Dalla metà del

20° secolo, vennero adoperati farmaci precedentemente utilizzati come agenti anti - infestanti per il trattamento delle forme adulte di *F. hepatica*.

Và menzionato l'utilizzo di entrambi i fenoli alogenati, come l'esaclorofene e il bitionolo, e due monofenoli con attività trematocida, il disofenolo e il nitroxinil. Dopo alcuni anni di ricerca, è stata scoperta l'attività trematocida del diafene. Le salicilanilidi come gruppo hanno una maggiore efficacia contro i trematodi adulti e un margine di sicurezza più ampio, consentendo il trattamento degli animali in gruppi per il controllo delle forme giovani (4-6 settimane di età). Come risultato, sono stati creati molti trematocidi con quelle caratteristiche nel corso del 1960: oxiclozanide, clioxanide, rafoxanide, brotianeide, bromoxanide e closantel. Da quel momento, l'uso profilattico di questi farmaci ha permesso lo sviluppo di sistemi di controllo che avrebbero dovuto ridurre la prevalenza dell'infestazione a livelli molto bassi. Tuttavia, nonostante i trattamenti ripetuti, la prevalenza di fasciolosi rimane molto elevata. L'era moderna degli antielmintici a largo spettro è iniziato con la registrazione del tiabendazolo, molto attivo contro *D. dendriticum*, ma privo di efficacia contro *F. hepatica*. Tra i benzimidazolici, l'albendazolo è stato raccomandato per il controllo della fasciolosi, nonostante la sua attività sia limitata ai parassiti di oltre 12 settimane (McKellar e Scott, 1990), ma ha un chiaro effetto inibitorio sullo sviluppo delle uova, a causa della sua elevata lipofilia (Mottier e al., 2003). L'albendazolo solfossido risulta invece più efficace per la sua maggiore affinità per la  $\beta$ -tubulina del parassita (Lacey e al., 1987 e Lubega e Prichard, 1991). Altri composti, i metilcarbammati, come il fenbendazolo, l'oxfendazolo e il mebendazolo hanno una certa attività ovicida contro *F. hepatica*, ma nessun effetto contro i parassiti (Fairweather e Boray, 1999). Un'eccezione è il flubendazolo che ha un effetto marcato sulla schiusa delle uova, ma anche contro i trematodi adulti, ma non è efficace come l'albendazolo. Il controllo della fasciolosi è fortemente basato sull'uso del triclabendazolo, che uccide tutti gli stadi grazie alla sua elevata efficacia contro il parassita (Boray et al., 1983), e presenta un ampio margine di sicurezza e una buona tolleranza. Il composto originario del triclabendazolo viene completamente rimosso dal sangue portale dal fegato e in seguito assorbito (Hennessy et al., 1987) e il trematode è in grado di solfossidare entrambi i farmaci ai loro metaboliti solfossidi che sono quelli farmacologicamente attivi presenti soltanto nel sangue degli animali

trattati (Marriner e Bogan, 1980 e Hennessy et al., 1987) e che si pensa siano responsabili della sua attività contro i parassiti epatici (Fairweather, 2005; Fairweather, 2009). Il triclabendazolo non ha alcun effetto sulla schiusa delle uova, ma ne interrompe la produzione a causa delle precoci alterazioni sul sistema riproduttivo a 24 ore dal trattamento (Hanna et al., 2012). L'eccellente efficacia del triclabendazolo contro le forme larvali e i trematodi adulti ha portato alla selezione e alla comparsa di popolazioni di trematodi triclabendazolo-resistenti in molte aree del mondo (Fairweather, 2000; Fairweather, 2009). È importante notare che il triclabendazolo e l'albendazolo possono penetrare nel tegumento di *F. hepatica* per diffusione (Alvarez et al., 2004 e Mottier et al., 2004). Prima dell'utilizzo del triclabendazolo, il closantel, il clorsulon e l'albendazolo erano i farmaci di scelta per il trattamento e il controllo delle fasciolosi. Tutti hanno un'elevata efficacia contro i trematodi maturi, e moderata (clorsulon), o bassa (albendazolo), contro le forme immature (Boray 1986, Zimmerman et al., 1986 Onar, 1990 e Rehbein e Visser, 1999).

In generale, lo sviluppo dell'antielmintico resistenza è influenzato da fattori legati al parassita, al sistema di gestione dell'antielmintico e all'ambiente (Jackson e Coop, 2000), e le sue dinamiche sono caratterizzate dall'aumento della prevalenza in modo esponenziale se l'efficacia degli antielmintici è molto bassa. La principale strategia per ritardare la perdita di efficacia degli antielmintici comporta necessariamente l'individuazione precoce della resistenza e l'adeguato utilizzo dell'antielmintico per preservarne la sua efficacia. L'esteso utilizzo (e l'abuso) di triclabendazolo nelle pecore naturalmente infette ha portato allo sviluppo di popolazioni di trematodi resistenti. L'apparente mancanza di segni clinici di malattia in un gregge suggerisce che la resistenza potrebbe essere un problema sottovalutato. In condizioni di campo la diagnosi dell'antielmintico resistenza può essere effettuata con il test di riduzione uova nelle feci (FECRT). Uno dei fattori più importanti da prendere in considerazione per lo svolgimento della FECRT è l'intervallo tra il trattamento e il campionamento. L'intervallo deve essere abbastanza lungo da permettere l'eliminazione delle uova che, nel caso di *F. hepatica*, possono rimanere nella cistifellea anche dopo la rimozione dei parassiti adulti (Taylor, 1964), ma abbastanza breve da precedere lo sviluppo di una nuova infestazione. Quindi, 14 giorni

sarebbero un adeguato intervallo tra il trattamento e il campionamento per il calcolo dell'efficacia dei farmaci contro i parassiti adulti (Alvarez et al., 2001 e Álvarez-Sanchez et al., 2006). Tuttavia, non è ancora nota la reale diffusione della resistenza ai trematocidi nella pecora. Dalla metà degli anni 1990, sono stati riportati diversi casi di resistenza al triclabendazolo da parte di *F. hepatica* in condizioni di campo in Australia (Overend e Bowen, 1995), Irlanda (O'Brien, 1998; Lane, 1998), Scozia (Mitchell et al., 1998), Paesi Bassi (Moll et al., 2000; Gaasenbeek et al., 2001) e Spagna (Álvarez -Sanchez et al., 2001; Álvarez -Sanchez et al., 2006; Vara-del Rio et al., 2005; Vara-del Rio et al., 2005b). Studi di campo hanno descritto nelle pecore resistenza al rafoxanide e al closantel (Boray e De Bono, 1989 e Boray, 1990), e reattività crociata con il nitroxinil (Boray, 1997) e resistenza all'albendazolo e al triclabendazolo in Spagna (Álvarez-Sánchez et al., 2001 e Álvarez-Sanchez et al., 2006). La mancata risposta al triclabendazolo nei casi acuti, potrebbe essere dovuta al fatto che deve essere metabolizzato nel fegato nella sua forma attiva e qualora il danno epatico fosse troppo grave, è molto difficile che questo avvenga. Il controllo delle alterazioni dei diversi tessuti del trematode (tegumento, intestino, muscoli e organi riproduttivi) potrebbe fornire informazioni sul tempo di azione dei farmaci e indicare in che modo questi cambiamenti potrebbero essere importanti per l'efficacia del farmaco stesso. L'esame delle modificazioni tegumentali è importante perché rappresenta l'interfaccia tra parassita e ospite, ed è la via principale con cui i metaboliti "alfa compound" penetrano nel trematode (McConville et al., 2009). Questo è vero per il triclabendazolo e altri trematocidi (Mottier et al., 2006; Toner et al., 2009). Il tegumento svolge anche una serie di ruoli importanti nella biologia del trematode, compresa la protezione contro l'attacco immunitario e l'azione antielmintica (Hanna, 1980; Fairweather et al., 1999). La resistenza ai trematocidi non sembra avere la stessa importanza dei nematodi gastrointestinali (Fairweather e Boray, 1999). Lo sviluppo della resistenza da parte dei trematodi potrebbe essere correlata a una varietà di fattori. I trematodi presentano alcune caratteristiche specifiche che determinano la struttura genetica della popolazione, come ad esempio l'alternanza di riproduzioni sessuate e asessuate nel loro ciclo vitale e il breve periodo di riproduzione. Un ciclo di vita indiretto favorisce la presenza delle forme parassitarie non esposte alla chemioterapia che competono con i ceppi resistenti, in

questo modo si può rallentare o ridurre lo sviluppo di resistenza (Medley, 1994). Tuttavia, sembrerebbe che la resistenza in *F. hepatica* possa insorgere rapidamente in determinate circostanze, quali adeguate condizioni climatiche, re-infestazioni durante l'anno, concomitanti infestazioni da nematodi gastrointestinali, uso improprio di antelmintici, etc. Tenendo presente la mancanza di nuovi farmaci per il prossimo futuro, la nascita di questo tipo di resistenza rappresenta una minaccia importante. Poiché non è noto se il meccanismo di resistenza è simile a quello precedentemente descritto per altri parassiti, devono essere prese in considerazione anche le possibili modifiche nel tegumento dei parassiti (Robinson et al., 2003). I parassiti hanno diverse possibili strategie per raggiungere la resistenza ai farmaci, tra cui ridotto assorbimento, la modifica di destinazione, la modifica del farmaco, il sequestro del farmaco, di shunt by-pass e la concorrenza sul substrato (Ouellette, 2001).

La P-glicoproteina fa parte del gruppo di trasportatori ATP-binding cassette (ABC) che funzionano come meccanismo di efflusso ATP-dipendente, che consente al farmaco di essere espulso dalle cellule (Gerlach e al., 1986). Una sovraespressione di P-glicoproteina è stata implicata nella resistenza dei nematodi ai lattoni macrociclici (Pouliot e al., 1997; Xu e al., 1998), al closantel e ai benzimidazolici (Wolstenholme e al., 2004).

La comparsa di resistenza ha spinto verso la ricerca di nuovi composti chimici e il migliore utilizzo dei farmaci esistenti (Meaney e al., 2006; Meaney et al., 2007; Devine et al., 2011; Devine et al., 2012). La necessità di una trematocida innovativo è stata enfatizzata dall'assenza di farmaci alternativi e dalla resistenza al triclabendazolo riportata in diversi continenti (Keiser e Utzinger, 2007). I farmaci alternativi testati includono nitazoxanide (Favennec et al., 2003), Mirazid (Haridy et al., 2003; Abo-Madyan et al., 2004), derivati dell'artemisina (Keiser et al., 2006a; Keiser et al., 2006b, Keiser et al., 2007; O'Neill et al., 2009) e il "composto alpha" derivato dal triclabendazolo.

L'infestazione naturale con diversi parassiti induce una risposta immunitaria, che fornisce una protezione adeguata contro le reinfezioni, di conseguenza la vaccinazione potrebbe essere un approccio alternativo per prevenire le elmintiasi. La maggior parte dei tentativi di sviluppare vaccini veterinari commerciali per gli elminti sono concentrati sull'identificazione di antigeni proteici, dato che sono dotati

di due importanti caratteristiche: possono essere relativamente facili da identificare, modificare e produrre economicamente in grandi quantità utilizzando moderne tecnologie molecolari, che li rende ideali come base per i vaccini commerciali e inoltre molti, giocando un ruolo chiave nel metabolismo del parassita possono pertanto rappresentare dei buoni bersagli per perturbare la biologia dello stesso. Diversi antigeni di *F. hepatica* sono stati segnalati come potenziali vaccini contro la parassitosi. Anche se non può essere effettuata una protezione totale, alcuni di questi provocano riduzione della crescita delle metacercarie, ridotta sopravvivenza degli stadi adulti, ridotta fecondità delle femmine, espulsione degli adulti, ridotta schiusa delle uova, riduzione del peso e delle dimensioni del parassita ecc.

Un altro antigene secreto dai trematodi adulti, l'emoglobina, potrebbe essere importante nel trasporto e/o nella conservazione dell'ossigeno nei trematodi in migrazione. La vaccinazione dei bovini con l'emoglobina ha indotto una protezione del 44% dall'infestazione con le metacercarie di *F. hepatica* e una riduzione del 60% della vitalità delle uova recuperate dagli animali vaccinati (Dalton et al., 1996). Anche il glutatione S-transferasi è coinvolto nelle fasi iniziali di detossificazione di xenobiotici e composti tossici endogeni, ed è stato scelto come antigene per un vaccino. La vaccinazione con glutatione S-transferasi conferisce resistenza contro la fasciolosi nella pecora (Sexton et al., 1990) e nei bovini (Morrison et al., 1996), e il livello di protezione sviluppato dipende dall'adiuvante. Tuttavia, l'efficacia del glutatione S-transferasi nelle prove del vaccino nei bovini non ha ridotto in modo significativo la carica parassitaria e il conteggio delle uova nelle feci. Il glutatione S-transferasi è stato valutato come vaccino, da solo o in combinazione con idrossido di alluminio e saponina nelle pecore contro *F. gigantica*. La massima riduzione della carica parassitaria (solo il 32%) è stata registrata nel gruppo vaccinato con glutatione S-transferasi-saponina.

### **Profilassi**

La prevenzione e il controllo efficace delle fasciolosi dovrebbero essere basati sull'applicazione corretta e integrata di diverse misure per ridurre la popolazione di lumache infette, eliminare i trematodi presenti negli animali ed evitare lo sviluppo di parassiti resistenti.

L'eliminazione del gasteropode ospite intermedio *G. truncatula* richiede una valutazione dell'habitat della lumaca, questo infatti potrebbe essere localizzato o esteso. In seguito bisognerebbe recintare le aree con una certa umidità o evitare il pascolo durante i periodi di alto rischio, una misura che nella pratica è spesso difficile da realizzare. Il miglior metodo per l'eliminazione permanente dei gasteropodi è il drenaggio, soprattutto con mattonelle di drenaggio sotterraneo, ma questo può risultare troppo dispendioso. Ridurre il pascolo paludoso con la costruzione di dighe potrebbe aumentare le zone di pascolo e eliminare gli habitat delle lumache. Il controllo chimico attraverso i molluschicidi può essere utile se effettuato con tecniche opportune. I più importanti sono niclosamide, pentaclorofenato di sodio e N-tritylmorpholine, e più recentemente prodotti vegetali e loro componenti attivi come citrale, acido ferulico, umbelliferone, azadiractina e allicina per le larve presenti nelle lumache infestate (Sunita e Singh, 2011). L'efficacia di questi prodotti è molto dubbia, a causa del grande potenziale biotico delle lumache e del costo della manodopera e dell'equipaggiamento speciale richiesto. Il trattamento preventivo delle pecore a fine inverno/inizio primavera è essenziale per ridurre la contaminazione dei pascoli con le uova prima della primavera e del periodo estivo. Nei paesi in cui gli animali sono chiusi in ricoveri in inverno, l'obiettivo è eliminare i trematodi prima dell'inizio della stagione di pascolo. Questa misura riduce la contaminazione dei pascoli e la successiva produzione di cercarie da parte delle lumache. Se nella tarda estate o nell'autunno precedente si è registrata un'elevata piovosità sul pascolo durante la tarda primavera o all'inizio dell'estate, potrebbe essere presente un gran numero di metacercarie eliminate dalle lumache infestate nell'autunno precedente (infestazione invernale), e in questo caso sono necessari trattamenti precedenti. Quando vengono utilizzati antelmintici con un'elevata efficacia contro le forme immature, il numero dei trattamenti annuali può essere ridotto. Inoltre, possono essere utilizzati dei sistemi computerizzati basati sulle precipitazioni l'evaporazione e i sistemi informativi geografici che simulano il ciclo di vita di *F. hepatica* e comprendono dati climatici, geografici e idrologici del terreno per prevedere la probabile incidenza e la gravità di fasciolosi. L'utilizzo dei metodi di gestione agricola per ridurre le possibilità di infestazione ha ricevuto attenzione per lungo tempo, in particolare prima della scoperta del primo trattamento efficace

contro la fasciolosi. La raccomandazione più semplice è quella di tenere il gregge lontano dalle zone in cui sono presenti le metacercarie mediante la recinzione degli habitat delle lumache e/o evitare il pascolo del gregge durante i periodi ad alto rischio di infestazione e effettuare un programma di rotazione del pascolo. L'eradicazione può essere teoricamente possibile, se i trattamenti vengono effettuati ogni 8 settimane durante il periodo di prepatenza di *F. hepatica*. Questo programma di controllo epidemiologico è valido anche per i composti meno efficaci contro i trematodi immaturi, ma in questo caso i trattamenti dovranno essere più frequenti in estate e in autunno. Dato che alcuni animali selvatici (cioè, cervi e conigli) possono fungere da serbatoio, l'eradicazione del parassita risulta molto difficile. Alcuni autori hanno espresso preoccupazione per il rischio di antielmintico resistenza. Un modo per contrastare lo sviluppo della resistenza è quello di considerare un approccio più strategico nel trattamento del trematode. Se i sintomi persistono dopo il trattamento, i campioni fecali devono essere controllati per almeno 3 settimane dopo lo stesso. Se le uova sono ancora presenti, gli animali devono essere trattati con un altro trematocida. Altre buone pratiche includono l'eliminazione del sotto-dosaggio, la corretta frequenza dei trattamenti e lo scoraggiare la pratica degli agricoltori di trattare gli animali e metterli direttamente su pascoli puliti. Anche il monitoraggio del conteggio delle uova e del numero di fegati eliminati al macello è comunque molto utile. Dove sono presenti habitat idonei per i gasteropodi ospiti intermedi, gli animali che arrivano in allevamento devono essere tenuti in quarantena e trattati con prodotti efficaci contro le forme immature e tenuti lontano dai pascoli contaminati per 4 settimane. Può essere necessario un trattamento di follow-up 6-8 settimane dopo il trattamento iniziale.

### **2.3. Paramfistomidi**

La paramfistomosi dei ruminanti è causata da trematodi della famiglia *Paramphistomidae* a cui appartengono i generi *Paramphistomum*, *Cotylophoron*, *Calicophoron* e *Gigantocotyle*, caratterizzati da una ventosa acetabulare subterminale molto grande munita di piega anulare (Boch e Supperer, 1980). Questi trematodi colpiscono il tratto gastro-intestinale, riscontrandosi da adulti nel rumine e nel reticolo (foto n°13), mentre allo stadio larvale nel primo tratto del duodeno.



## Morfobiologia

La paramfistomosi è legata ad un circuito biologico strettamente specifico, che trova le sue basi al limite tra due biotopi, il pascolo e gli ambienti umidi, che formano al loro confine un ecotono particolare in cui si sviluppano gli ospiti intermedi (molluschi dei generi *Bulinus*, *Planorbis*, *Lymnea*, ecc.) e si riscontrano le metacercarie infestanti nelle erbe. I parassiti adulti hanno una forma conica di color rosso-roseo lunghi dai 5 sino a 14 mm, con atrio genitale fornito o meno di sfintere genitale e/o papillare a seconda dei generi e/o specie considerati (foto n°14, 15). Questi vivono “fissati” con una robusta e ampia ventosa acetabulare soprattutto alla parete del rumine e del reticolo nutrendosi di detriti vegetali, batteri e protozoi in essi contenuti. Questo tipo di alimentazione ha fatto sì che i paramfistomidi adulti fossero talvolta ritenuti non dei parassiti, ma degli agenti commensali dei ruminanti.

La fase esterna del ciclo dei paramfistomidi è simile a quella di *F. hepatica*. Le uova eliminate opercolate, lunghe 120-150 micron e larghe 60-80 micron (foto n°16), maturano nell’ambiente esterno a temperature di 24-27 gradi in 10-15 giorni dando origine ad un miracidio ciliato, che fuoriuscito dall’uovo può sopravvivere per massimo 24 ore nell’ambiente esterno. Questo deve penetrare nei molluschi ospiti intermedi, perde quindi il rivestimento ciliato e si trasforma in sporocisti che dopo 1-2 settimane diventano redie (Horak, 1971); possibile anche una seconda generazione di redie che daranno origine alle cercarie, caratterizzate da una particolare pigmentazione scura e da 2 ocelli (Sey, 1991). Le cercarie una volta abbandonato il mollusco ospite intermedio, soprattutto sotto l’effetto di una forte illuminazione che perdura per almeno 10 minuti (Euzeby, 1975); si incistano nelle erbe, trasformandosi in metacercarie di circa 300 micron di diametro, visibili quindi ad occhio nudo, di colorito scuro (marron/nero) (foto n°17). Le metacercarie possono sopravvivere dai 3 ai 9 mesi in condizioni di umidità (Horak, 1962) e generalmente non superano i rigori invernali. I ruminanti, ospiti definitivi, si infestano per ingestione delle metacercarie con le erbe. Dopo la fase di disincistamento che avviene nell’abomaso e nel duodeno, le forme larvali aderiscono all'epitelio della prima parte dell'intestino tenue, che poi attraversano localizzandosi in posizione sottomucosa; successivamente migrano quindi verso l’abomaso 10-35 giorni prima di stabilirsi nella sede definitiva, il rumine e il reticolo, dove diventeranno parassiti adulti. Secondo Deiana e Arru

(1963) le adolestarie che si repertano nell'intestino tenue sono da considerare parassiti erratici i quali sono eliminati attraverso il canale digerente prima che abbiano raggiunto la maturità sessuale; la forma intestinale si verificherebbe quindi, secondo questi Autori, al seguito di infestioni massive del ruminante di soggetti che al pascolo abbiano ingerito eccessive quantità di metacercarie. Tuttavia successive prove sperimentali effettuate sempre dagli stessi Autori (Arru et al., 1970) confermavano in effetti la presenza "obbligatoria" di una fase intestinale.

Il periodo di prepatenza varia tra 3 e 3,5 mesi nelle pecore. La durata di vita dei parassiti può arrivare anche fino a 4 anni, tuttavia non si hanno dei dati precisi in merito, mentre un dato certo è che, con il passare dei mesi, i parassiti perdono gradatamente la loro fertilità, pur sopravvivendo anche per diverso tempo (talvolta anche anni) nella loro sede di localizzazione definitiva (Rojo-Vázquez et al., 2012).

### **Note epidemiologiche**

La paramfistomosi è diffusa in tutto il mondo, soprattutto nei paesi tropicali e subtropicali, e durante l'estate e l'autunno. Negli ultimi anni ci sono stati un numero crescente di casi segnalati, in alcune aree dell'Argentina e in Europa (Raccioppi et al., 1995; Bulman et al., 2002; Mage et al., 2002; e Sánchez et al., 2005). Negli ovini l'infestazione è ancora meno frequente rispetto ai bovini (Simon-Vicente, 1966).

La paramfistomosi si riscontra con una certa frequenza nei paesi del bacino del Mediterraneo (Arru e Deiana, 1969). Nel corso degli ultimi decenni sono aumentate le segnalazioni di infestioni miste causate da diverse specie di trematodi in un certo numero di paesi dell'Europa occidentale, probabilmente a causa di un'aumentata movimentazione dei piccoli ruminanti e dei cambiamenti climatici che rendono gli ambienti frequentati dagli animali idonei allo sviluppo dei loro ospiti intermedi (Taylor, 2010).

Anche alcuni cambiamenti di management aziendale, quale il ridotto uso di erbicidi e l'incidenza crescente di inondazioni che facilitano l'accesso degli animali ad aree a rischio, possono spiegare i livelli di infestazione più elevati recentemente riportati in paesi come la Gran Bretagna e l'Irlanda (Foster et al., 2008; Murray et al., 2010).

Nella Francia orientale l'infestazione da *Calicophoron daubneyi* veniva rilevata in allevamenti di capre in tutta l'area. 58,1% delle aziende ha presentato almeno un animale che eliminava uova di *C. daubneyi*, con prevalenze medie del 35% che

variavano dal 7% al 93%. 72,5% delle capre positive eliminavano meno di 100 UPG (Paraud et al., 2009). Sempre in Francia, Ambrous et al. (1999) indicavano delle variazioni di prevalenza all'interno delle greggi di pecora variabili dal 16 al 75% e notarono che la prevalenza era correlata positivamente ai livelli medi di UPG del gregge. In Italia la paramfistomosi è stata segnalata in varie regioni (Piemonte, Lombardia, Veneto, Emilia Romagna, Marche, Umbria, Lazio, Campania, Puglia e Basilicata); in Italia la parassitosi veniva segnalata forse per la prima volta da Civinini (1842), che evidenziava *Paramphistomum cervi* nel ruminale di bovini della Maremma Toscana, ma è soprattutto nei caprini che è stata studiata nella sua forma acuta intestinale (Deiana et al., 1962). Nell'isola sono stati inoltre condotti diversi studi sulla presenza e distribuzione nel territorio dei molluschi ospiti intermedi, identificati in *Bulinus contortus* e *Planorbis planorbis*, in cui peraltro venivano analizzate le percentuali di infestazione con le forme larvali del trematode nell'arco dell'anno (Deiana et al., 1966; Arru e Deiana, 1969). Tali studi tuttavia potrebbero perdere la loro validità nel caso in cui l'agente della paramfistomosi in Sardegna fosse *C. daubneyi*, che utilizza quale ospite intermedio *G. truncatula* e non *Bulinus* spp. e/o *Planorbis* spp.

Giannetto et al. (1994) segnala presenza di *Calicophoron microbothrium* in ovini e caprini della Sicilia. Cringoli et al. (2004), riscontrano la paramfistomosi da *C. daubneyi* nel 16,2% delle aziende ovine degli Appennini meridionali tra la Campania, la Puglia e la Basilicata, con livelli medi di UPG di 52; le analisi condotte evidenziavano inoltre alcune correlazioni tra le aziende positive a questo trematode ed alcuni fattori ambientali. In Sardegna Sey e Arru (1977), segnalavano la presenza di *P. microbothrium* e di *P. daubneyi*. La classificazione effettuata su basi morfometriche, quale quella attuata prima dell'avvento della biologia molecolare, nell'ambito dei paramfistomidi presenta tuttavia non poche difficoltà, per cui non possiamo escludere che le specie indicate nelle indagini tassonomiche condotte prima degli anni '90 debbano, o possano, essere prese in considerazione con molta prudenza. In ogni caso la presenza nel territorio nazionale della specie *C. daubneyi*, comporta parallelamente anche una revisione di alcune caratteristiche epidemiologiche della parassitosi, in quanto usufruendo tale specie come già accennato, dello stesso mollusco ospite intermedio di *F. hepatica*, cioè *G. truncatula*,

queste due distomatosi tendono a sovrapporsi nello stesso areale. Infatti la paramfistomosi può quindi diffondersi non solo in habitat permanenti, più facilmente colonizzati soprattutto da popolazioni di molluschi dei generi *Planorbis* e *Bulinus*, ma anche in habitat temporanei in cui la *G. truncatula* può facilmente svilupparsi. In questo senso quindi la paramfistomosi potrebbe quindi essere considerata una parassitosi emergente, così come anche recentemente riportato anche da Taylor (2012) per alcuni distretti del nord Europa.

Gli studi condotti per valutare eventuali relazioni tra l'età dei ruminanti e il livello di infestazione e/o livello di eliminazione di uova hanno fornito risultati non uniformi. Szmidi-Adjidé et al. (2000) non hanno evidenziato in bovini controllati al mattatoio alcuna correlazione tra età e paramfistomosi, al contrario, Dorchies et al. (1998), così come anche González-Warleta et al. (2008), hanno rilevato che bovini più anziani risultano maggiormente infestati. In certi casi l'assenza di tale relazione potrebbe essere posta in rapporto con i numerosi trattamenti annuali di routine effettuati nei confronti della parassitosi nei territori monitorati.

Secondo Horak (1971) il bovino gioca un ruolo importante quale contaminatore ambientale per l'ovino, attraverso l'eliminazione delle uova, infatti anche secondo Silvestre et al. (2000), i fattori di rischio più importanti per l'insorgenza della parassitosi nelle capre sono dati dal pascolo in promiscuità con i bovini e dalla presenza di pascoli umidi.

Nell'ovino l'infestazione risulterebbe quindi meno frequente rispetto al bovino che pascola nelle stesse aree (Simón-Vicente, 1966), così come riportato in Spagna, nelle zone di Córdoba e nell'area Basca (Martínez Gómez e Hernández Rodríguez, 1971; García Pérez et al., 1993). Infine la capra, sembrerebbe più sensibile dell'ovino alla paramfistomosi, in quanto consentirebbe uno sviluppo di parassiti di dimensioni maggiori, così come rilevato in riproduzioni sperimentali della malattia contemporaneamente in queste due specie animali (Deiana et al., 1962).

### **Sintomatologia e lesioni**

Dal punto di vista clinico si distinguono due forme: 1) acuta-subacuta intestinale, causata dalle forme giovanili (adolescarie) nel primo tratto del duodeno; 2) cronica rumino-reticolare provocata dai trematodi adulti.

La prima, che si può evidenziare nelle infestazioni massive a partire dal 10° giorno dall'ingestione delle metacercarie (Euzeby, 1975), si caratterizza per l'insorgenza di una improvvisa diarrea fetida, con dimagrimento, ipoproteinemia e anemizzazione, con edemi nelle parti declivi del corpo, in particolare nelle infestazioni gravi da *Calicophoron* spp. con forme sottomandibolari (bottle jaw) (Reinecke, 1983) con mortalità spesso anche elevata (10-20 %). In certe aree quali l'India, il Sud Africa e l'Australia la mortalità poteva raggiungere negli ovini anche valori dell'80% (Boray, 1959; Soulsby, 1987).

I parassiti immaturi nel piccolo intestino possono causare erosioni, petecchie, aree necrotiche e un'eccessiva produzione di muco con un infiltrato eosinofilo (Rojo-Vázquez et al., 2012). Nell'ovino secondo Boray (1971) l'azione meccanica-aspirante dell'acetabulo dei giovani parassiti sulla mucosa intestinale ed abomasale determina problemi di irrorazione; tutto questo porterebbe alla formazione di aree di necrosi e di piccole emorragie che possono aggravarsi in seguito ai movimenti peristaltici dei visceri, conducendo talvolta così anche ai fenomeni di anemia. Alla necroscopia, può essere presente edema dei tessuti sottocutanei, delle pieghe abomasali e raccolta di liquido nelle cavità a causa di ipoproteinemia. La colecisti è spesso dilatata, e l'intestino tenue congestionato. I trematodi immaturi che hanno attraversato in profondità la parete intestinale possono essere visibili attraverso la sierosa. Può essere osservata una duodenite catarrale necrotica ed emorragica con un piccolo ispessimento nelle prime fasi, in seguito può aversi un'aumento dell'ispessimento, con la formazione di emorragie e ulcere. Inoltre sono presenti lesioni ai linfonodi mesenterici, che si presentano ingrossati ed edematosi; in questi casi i giovani elminti di color rosa/marrone si riscontrano sulla superficie o inglobati nella mucosa dei primi 3 metri del piccolo intestino, che si può presentare in preda ad un'inflammatione catarrale e/o emorragica, con possibili aree necrotiche ed ispessimento progressivo della parete (Rolfe et al., 1994; Rojo-Vázquez et al., 2012). La seconda forma invece si rende manifesta solo nei casi di infestazioni di una certa entità che porta a diminuzione dell'appetito con dimagrimento, anemia, leucopenia, turbe della funzionalità dei prestomaci e talvolta emissione di feci diarroiche picee particolarmente maleodoranti (Ambrosi, 1995; Vercruyse et al., 1998; Rolfe and Boray, 1993); altri sintomi sono la sete, la disidratazione e anche una riduzione

importante della produzione di latte (Spence et al., 1996). Nella forma cronica può essere rilevata una ruminite ulcerativa con atrofia delle papille del ruminale (Rojo-Vázquez et al., 2012), con la formazione di lesioni a poppatoio derivanti da un'azione di "strangolamento" causata dalla potente ventosa acetabulare che "ancora" il parassita alla parete dei prestomaci. Questa può svilupparsi anche in seguito ad infestazioni pesanti, di solito a fine estate o inizio inverno a causa dell'allagamento prolungato dei pascoli (Rolfe et al. 1991). Rari i casi in cui si può parallelamente evidenziare una degenerazione torbido-grassa del fegato con aumento del volume dell'organo (Ambrosi, 1995).

In seguito ad una prima infestazione gli animali risultano parzialmente protetti contro le reinfestazioni, in quanto riducono il numero di elminti presenti e l'importanza dei segni clinici (Rojo-Vázquez et al., 2012).

### **Diagnosi**

I punti cardine della diagnosi si identificano con un'attenta analisi dei dati epidemiologici e dei sintomi, anche se talvolta questi soprattutto nelle forme croniche risultano assai poco specifici (Rieu et al., 2007). Per questo motivo l'analisi copromicroscopica volta alla ricerca e quantizzazione delle uova rappresenta sicuramente lo strumento più valido, insieme al dato anatomo-patologico e/o alla ricerca delle forme immature nelle feci (adolescarie rosate di 2-4 mm di diametro), che nel corso della forma acuta possono raggiungere nell'ovino numeri veramente elevati (più di 30.000 nel duodeno e fino a 4.000 nell'abomaso) (Euzeby, 1975). Altrettanto utile risulterebbe l'acquisizione di dati su animali regolarmente macellati di greggi sospetti, dato che però purtroppo spesso viene "dimenticato", in quanto l'esame dei prestomaci, soprattutto nei piccoli ruminanti in sede di visita post-macellazione viene spesso omissso.

La ricerca delle uova dei paramfistomidi deve essere effettuata secondo tecniche appropriate in grado di rilevare le caratteristiche uova "pesanti" dei trematodi. Nel caso specifico quindi la sedimentazione semplice o "ripetuta", può rappresentare un buon approccio diagnostico, in quanto la grandezza delle uova permette una loro non difficoltosa evidenziazione allo stereomicroscopio o al microscopio ottico a piccolo ingrandimento. Piuttosto appare essenziale la differenziazione delle uova dei paramfistomidi da quelle di *F. hepatica*, per via delle caratteristiche morfometriche

abbastanza sovrapponibili. Le uova dei paramfistomidi hanno un aspetto grigio/trasparente, mentre quelle di *F. hepatica* hanno una caratteristica colorazione giallastra; tale caratteristica tuttavia può essere difficile da percepire da un occhio non allenato, soprattutto in caso di singole infestioni, mentre in infestioni miste con presenza di entrambi i tipi di uova tale differenza risulta sicuramente più facilmente apprezzabile. L'uso di appositi filtri può aiutare la differenziazione microscopica di queste forme di propagazione. Ulteriori particolari morfologici differenziali sono dati da particolari più difficilmente rilevabili o meno oggettivi, quali ad esempio l'evidente nucleo germinativo centrale nelle uova dei paramfistomidi che invece risulta difficilmente apprezzabile nel caso di quelle di *F. hepatica*, o la forma di norma regolarmente ovale delle uova dei paramfistomidi rispetto alla forma ellittica di quelle di *F. hepatica*.

Importante inoltre, come suggerito da Ambrosi (1995), procedere anche ad un'analisi che possa quantizzare il numero delle UPG, in quanto esisterebbe una buona correlazione tra livelli di UPG e numero di parassiti adulti in localizzazione: secondo Rieu et al. (2007) livelli maggiori di 100 UPG indicano almeno 100 parassiti adulti in localizzazione. Purtroppo però tale correlazione è stata studiata soprattutto nel bovino, mentre i dati relativi ai piccoli ruminanti "languono"; in ogni caso, sempre secondo Ambrosi (1995), valori di UPG medi di 250-300, con punte di 600-700 sarebbero indice di colonizzazione da parte di parassiti adulti in grado di determinare delle alterazioni subcliniche da non sottovalutare. Negli ovini la presenza di un numero di parassiti adulti inferiore alle cento unità sembrerebbe evidenziabile già coprologicamente (Ambrosi, 1995). Purtroppo l'elevato peso specifico delle uova dei trematodi prevede delle tecniche che implicano per la fase di flottazione l'uso di soluzioni "pesanti" talvolta costose, corrosive, tossiche e/o cancerogene, che impongono particolari norme per il loro smaltimento e per la sicurezza dell'operatore tali da essere state bandite da molti laboratori, così come per le uova degli altri trematodi (*F. hepatica* e *D. dendriticum*); appare in ogni caso evidente che la diagnosi copromicroscopica nei confronti della paramfistomosi debba essere specificatamente richiesta ai laboratori che normalmente non la attuano di routine. Tutte queste situazioni, insieme ai mancati controlli dei prestomaci, generalmente rendono questa parassitosi sottostimata. Il ricorso a nuove tecniche

copromicroscopiche, quali quelle che prevedono l'uso del Flotac<sup>®</sup>, potrebbero in questi casi aiutare a risolvere tali problemi diagnostici in virtù della loro maggior sensibilità (Cringoli, comunicazione personale).

Interessanti sviluppi potrebbero derivare dalla messa a punto di tecniche immunodiagnostiche volte alla ricerca di IgG in ELISA tramite l'uso di antigeni di escrezione/secrezione attualmente valide soprattutto per indagini epidemiologiche, in quanto non ancora in grado di identificare con sicurezza il singolo soggetto, poichè sono state descritte reazioni crociate con *Fasciola* e *Dicrocoelium* spp. (Diaz et al., 2006).

L'analisi biochimica della componente muscolare in giovani ovini con paramfistomosi cronica evidenzia una diminuzione dell'azoto totale e del fosforo, mentre aumenta il tenore in acqua (Mikhailova et al., 1972).

### **Trattamento**

La molecola dotata di maggior efficacia, seppure non specifica per i paramfistomidi, è l'ossiclozanide, somministrata alla dose di 15 mg/kg (Boray, 1986), anche perché la niclosamide, che nell'ovino al dosaggio variabile da 50 a 100 mg/kg p.v. era dotata di un'eccellente attività soprattutto sui parassiti immaturi (Euzeby, 1975; Ambrosi, 1995), non è più disponibile in commercio. Secondo Rolfe e Boray (1987) l'ossiclozanide in combinazione con il levamisolo è l'antelmintico più efficace per il trattamento delle forme acute-subacute somministrato per due volte a distanza di due giorni.

L'efficacia dell'ossiclozanide alla dose di 15 mg/kg p.v., viene anche confermata da Sahai et al. (1983), che ottengono la riduzione del 100% dei parassiti in localizzazione in capretti indiani infestati sperimentalmente con *P. cervi* e da Paraud et al. (2009) su capre francesi infestate sperimentalmente con *C. daubneyi* che notano una riduzione superiore al 95% del numero dei parassiti adulti. In Francia tuttavia esistono dei problemi di somministrazione di tale farmaco nelle capre, in quanto a tale dosaggio si supererebbero, in questa specie animale, i limiti che le normative impongono, perchè il volume somministrato supererebbe la denominata "Stop-dose" che risulta pari a 20 ml della soluzione di 3,4% per tutti gli animali oltre 45 kg; ciò comporterebbe, essendo tale regolamento seguito dalla maggior parte degli



agricoltori, un sotto-dosaggio nelle capre più pesanti (Paraud et al., 2009), che potrebbe comportare l'insorgenza di fenomeni di farmacoresistenza.

Proprio per ovviare anche a questi inconvenienti, oltre che per evidenti questioni economiche, per il trattamento della paramfistomosi acute degli ovini, Bath, van Wyk (2009) propongono di trattare esclusivamente i soggetti con l'edema sottomandibolare (trattamento mirato selettivo), così come per altre parassitosi in cui viene suggerito il trattamento dei soggetti in base alla valutazione degli score di alcuni sintomi, quali la presenza dell'edema sottomandibolare per fasciolosi acute, per nematodi ematofagi (es. *Haemonchus*) o lo score dello scolo nasale nell'estrosi, quello del grado di anemia con il sistema FAMACHA sempre per i parassiti ematofagi, della diarrea per le infestioni intestinali tramite il sistema DAG SCORECARD, o ancora il riscontro del Body Condition Score soprattutto per le parassitosi debilitanti.

In Italia purtroppo mancano i dati derivanti da *trial* di campo nel settore ovino che possano confermare le percentuali di efficacia dell'ossiclozanide associata al levamisolo. Appare quindi evidente che un *trial* di campo attuato sull'ovino nel nostro territorio potrebbe consentire di acquisire dei dati importanti per una conferma o meno dell'efficacia di questa associazione farmacologica anche in Italia.

### **Profilassi**

Gli interventi ambientali costituiscono per il controllo della paramfistomosi un tassello essenziale. Appare importante il controllo dell'abbeverata soprattutto in ambienti non stanziali, nei quali si fa ricorso generalmente ad ambienti acquatici spontanei (quali quelli che spesso riguardano gli ovini in Sardegna). Ovviamente di difficile o impossibile applicazione pratica è la lotta ai molluschi ospiti intermedi attraverso l'uso di malacocidi a causa delle normative vigenti relative alle molecole utilizzabili e delle possibili contaminazioni ambientali derivanti.

Da qui l'importanza dell'applicazione di trattamenti chemio-profilattici sugli animali in grado di limitare i danni causati dalla parassitosi e l'inquinamento ambientale dei capi fortemente positivi, anche perché purtroppo la somministrazione di preparati a base di metacercarie irradiate, pur dimostrando una certa efficacia immunizzante (Hafez e Rao, 1986; Gill e Bali, 1988), non sono ancora disponibili in commercio.

## 2.4. CHIAVI TASSONOMICHE STORICHE PARAMFISTOMIDI

La famiglia Paramphistomidae è stata divisa da Fiscoeder (1901, 1902, 1903) in due nuove sottofamiglie, Paramphistominae e Cladorchiinae. Stiles e Goldberger (1910) assegnarono la famiglia Paramphistomidae di Fiscoeder e due nuove famiglie, la Gastrodiscidae e la Gastrothylacidae alla superfamiglia Paramphistomoidea. Loro restrisero i Paramphistomidae alle sottofamiglie Paramphistominae e Cladorchiinae di Fiscoeder, 1901 e Diplodiscinae di Cohn, 1904. Da allora ci sono state aggiunte e cambiamenti nella struttura della famiglia. I maggiori sistemi di classificazione proposti dal 1910 sono stati quelli di Stunkard (1917, 1925) Maplestone (1923), Fuhrmann (1928), Fukui (1929), Travassos (1934), Nasmärk (1937), Southwell e Kirshner (1937), Szidat (1939), Skrjabin (1949), Yamaguti (1958, 1971) e Baer & Joyeux (1961). Le opinioni sullo scopo e la suddivisione della famiglia sono molto variabili nei vari autori.

Inoltre, qualche sistema era basato soltanto su un'analisi della letteratura e non su un esame di campioni estensivo e critico. Nessun sistema pubblicato è del tutto soddisfacente ma quello proposto da Yamaguti (1971) sembrerebbe essere il più completo. La divisione è la seguente:

Paramphistomoidea

Paramphistomidae

Paramphistominae	Paramphistomum (Syn.: Liorchis, Srivastavaia)
	Calicophoron (Syn.: Bothriophoron)
	Gigantocotyle
	Explanatum
	Cotylophoron

Orthocoeliinae	Orthocoelium (Syn.: Ceylonocotyle, Cochinocotyle)
	Bilatorchis
	Leiperocotyle

Stephanopharynginae	Stephanopharynx
---------------------	-----------------

Balanorchiinae	Balanorchis (Syn.: Verdunia)
----------------	------------------------------

La famiglia Paramphistomidae è un grande assemblaggio di parassiti di quasi tutti i gruppi di vertebrati. Molti di quelli che infestano i mammiferi si trovano nei ruminanti. La classificazione dei paramfistomidi è stata basata molto su aspetti morfologici e istologici

### **Aspetti morfologici - Forma del corpo e taglia**

Alcuni paramfistomidi sono conici, altri invece risultano appiattiti dorso-ventralmente. La forma del corpo e la taglia possono anche dipendere dallo stato di rilassamento del parassita durante la fissazione e dal tipo di fissativo usato che influenza il grado di restringimento. Ma la forma del corpo varia moltissimo nell'ambito della stessa specie ed è influenzata da alcuni fattori come l'età e la gravità dell'infestazione, il sito di attacco nell'ospite, la specie ospite e le differenze nel tasso di crescita, anche nella stessa classe di età. Horak (1967) dimostrò sperimentalmente che *Paramphistomum microbothrium* cresce maggiormente e migra più rapidamente nei bovini rispetto agli ovini e ai caprini.

Inoltre nei bovini, i parassiti attaccati al pilastro ruminale anteriore hanno dimensioni maggiori rispetto a quelli attaccati a quello posteriore, e succede il contrario negli ovini. La taglia è comunque influenzata da diversi fattori e pertanto non risulta affidabile per la classificazione. Tuttavia, quando la fissazione è soddisfacente, la forma può essere presa in considerazione, ma con la dovuta attenzione.

### **Dimensioni dell'acetabulum e del faringe**

Le dimensioni dell'acetabulum e del faringe, in combinazione con altri caratteri, sono state considerate importanti da Nasmärk (1937) e sono state la base per la distinzione dei generi *Gigantocotyle* e *Macropharynx*.

Horak (1971) mostrò sperimentalmente che nel *Paramphistomum microbothrium*, la lunghezza totale del corpo era molto variabile al contrario delle dimensioni acetabulari. Concluse che le misure acetabulari fornivano delle indicazioni più accurate della taglia rispetto alla lunghezza totale del corpo. L'acetabulum è caratteristicamente largo e prominente nei generi *Gigantocotyle* e *Explanatum* ed entrambi sono immediatamente distinguibili dagli altri generi da questo carattere. L'acetabulum e la faringe sono organi con una certa componente muscolare e la loro

rigidità li rende delle strutture molto stabili e meno soggette alla deformazione del corpo come risultato della contrazione e del rilassamento dei campioni durante la fissazione. La presenza o l'assenza di una borsa o diverticolo faringeo è un carattere tassonomico molto importante. I generi *Stephanopharinx* e *Balanorchis* sono caratterizzati dalla presenza di una singola ma voluminosa borsa e diverticoli più piccoli ma appaiati. Entrambi i generi si distinguono dalla maggior parte dei generi dei ruminanti che non presentano queste strutture.

### **Esofago e ciechi**

La lunghezza dell'esofago, nonostante sia stata sempre presa in considerazione nelle descrizioni di specie, non ha un valore tassonomico a causa della sua elasticità.

Lo sviluppo muscolare della sua parete e la superficie interna sono comunque importanti caratteri. Nei paramfistomidi, così come in molti trematodi digenei, i ciechi consistono di due tubi a fondo cieco che si sviluppano attorno alle parti del corpo. Il tipo e il decorso dei ciechi sono stati inclusi da Fiscoeder (1903) nelle caratteristiche distintive di alcune specie da *P. cervi*. Alcuni autori hanno dimostrato che le circonvoluzioni dei ciechi e la direzione dei loro fondi ciechi sono costanti e caratteristiche delle specie da loro esaminate.

### **Organi dell'apparato genitale**

Lo sviluppo degli organi genitali e le loro forme e dimensioni sono caratteri distintivi utilizzati nei paramfistomidi e in altre famiglie di trematodi digenei. Stiles e Goldberger (1910) utilizzarono la disposizione e le dimensioni rispetto ad altri organi per distinguere nuove specie e come chiavi per le specie del genere *Paramphistomum*. Lo sviluppo della parte muscolare è assieme ad altri un carattere distintivo. Questo è stato impiegato per la prima volta da Fiscoeder (1902, 1903) per suddividere in gruppi le specie del genere *Paramphistomum*.

### **Papille tegumentali**

Alcuni autori hanno osservato e incluso nelle descrizioni di alcune specie di paramfistomidi la presenza di papille tegumentali ma non è stata mai considerata la loro importanza tassonomica prima di Fukui (1929) che per la prima volta le considerò importanti per l'identificazione di specie. Concluse che nei *Paramphistominae* erano quasi sempre presenti papille di piccole dimensioni,

specialmente attorno all'apertura orale, e che la loro distribuzione differiva nelle diverse specie.

Il microscopio elettronico a scansione è sempre più utilizzato nella descrizione della superficie degli elminti e molte specie di trematodi sono stati esaminati con questo metodo.

Lo studio al microscopio elettronico delle specie esaminate dimostra la presenza di strutture di superficie chiamate papille tegumentali. La loro presenza, distribuzione e tipo sono costanti nelle stesse specie, e nei campioni appartenenti a differenti ospiti, localizzazioni ed età. Questo è stato dimostrato con l'esame di due gruppi di *Calicophoron microbothrium*, ciascuno di diverse età.

In *Calicophoron* le papille quando presenti si trovano in quattro aree del corpo, attorno all'apertura buccale, attorno al poro genitale, nella parete dell'atrio genitale, e attorno all'acetabulum. Possono trovarsi o in una singola area o in varie possibili combinazioni delle quattro aree. Le papille attorno all'acetabolo sono poche, piccole e disposte in modo casuale, quelle attorno alla parete del poro genitale sono grandi e molto vicine. Quelle attorno al poro genitale sono di solito un'estensione di quelle attorno all'apertura orale e sono dello stesso tipo e taglia.

Papille anteriori non ciliate a forma di cupola conica: *Calicophoron calicophorum*, *C. clavula*, *C. daubneyi*, *C. microbothrium*, *C. microbothrioides*, *C. phillerouxi*, *C. raja*, *C. sukari*, *C. sukumum*, *Paramphistomum epiclitum*, *P. gotoi*, *P. hiberniae*, *P. ichikawai*, *P. leydeni*, *P. liorchis*.

Papille anteriori piccole e tozze coperte da processi simili a capelli: *Paramphistomum gracile*.

Papille anteriori assenti: *Paramphistomum cervi*, *P.cephalophi*.

### **Aspetti istologici**

Nasmärk (1937) introdusse una nuova classificazione basata sulla struttura istologica dell'acetabolo, della faringe e dell'estremità genitale. Classificò l'acetabulum, la faringe e l'estremità genitale in differenti tipi strutturali.

**Acetabulum:** i tipi di acetabulum secondo Nasmärk (1937) sono basati sulla differente disposizione della muscolatura, in particolare della serie di muscoli circolari. Ha menzionato quattro serie di muscoli circolari, due nella parte dorsale (dorsali interni ed esterni) e due nella parte ventrale (ventrali interni ed esterni).

Nasmärk considerò l'acetabulum come uno dei caratteri distintivi dei generi *Paramphistomum*, *Calicophoron* e *Ceylonocotyle*.

*Paramphistomum type*: dimensioni medie, i muscoli dorsali esterni circolari consistono di due gruppi di unità, quelle del primo gruppo ben sviluppate, quelle del secondo gruppo più piccole ma in numero maggiore. Quelli ventrali esterni consistono soltanto di un singolo gruppo di unità. Quelli dorsali e ventrali interni sono ben sviluppati ma diminuiscono di dimensioni verso l'interno. Quelli medi circolari consistono di unità irregolarmente distanziate. Le fibre radiali sono abbastanza sviluppate, le oblique sono poche e relativamente poco sviluppate e le esterne longitudinali sono poche ma distinte.

*Calicophoron type*: taglia media, simili al tipo paramphistomum specialmente per quanto riguarda le strutture circolari, ma i muscoli dorsali esterni consistono di un singolo gruppo di unità. Le fibre radiali sono abbastanza ben sviluppate, le fibre oblique sono poche e abbastanza sviluppate e le esterne longitudinali sono poche ma distinte.

**Faringe**: come l'acetabulum, i differenti tipi di faringe stabiliti da Nasmärk (1937) sono basati sulla disposizione e lo sviluppo della muscolatura. Dinnik (1964) dimostrò, dopo uno studio comparativo della struttura faringea di varie specie appartenenti a differenti ospiti, che i tipi faringei di *Paramphistomum*, *Calicophoron* e *ijimai* descritti da Nasmärk (1937) sono di base identici e possono essere considerati appartenenti allo stesso tipo, chiamato *Calicophoron type* dallo stesso Dinnik (1964).

*Calicophoron type*: labbro, e sfinteri anteriore e posteriore assenti. Unità circolari interne moderatamente sviluppate, unità medie circolari di solito assenti ma possono essere scarsamente sviluppate e indistinte, unità basali circolari moderatamente sviluppate. Le fibre longitudinali interne sono moderatamente sviluppate e quelle esterne sono poche e terminano sulla parete esterna, le fibre radiali sono moderatamente sviluppate.

**Estremità genitale**: Nasmärk usò il termine atrio genitale per indicare tutta la struttura terminale dell'apparato genitale che si apre all'esterno con il poro genitale. Questo include anche la papilla genitale, le pieghe della parete attorno a questa e le

differenti cavità incluse nella parete. Nasmärk distinse differenti tipi di estremità genitali basate sul diverso sviluppo della muscolatura.

*Calicophoron type*: caratterizzato dalla presenza di un pilastro o colonna retrattile. La piega e la papilla genitale sono piccole e si trovano sulla parte libera del pilastro genitale. Lo sfintere genitale e della papilla sono poco sviluppati ma distinti. Le fibre radiali sono ben sviluppate. La piega e l'atrio ventrale sono assenti.

**Esofago**: molti autori concordano sul fatto che lo sviluppo della muscolatura della parete dell'esofago è molto importante nella diagnosi specifica. La parete può essere uniformemente sottile o molto spessa nella sua lunghezza, e l'estremità posteriore può terminare con un piccolo sfintere o in un grande bulbo muscolare.

Quello che traspare è che nessun carattere istologico o morfologico da solo è sufficiente per differenziare generi e specie e che la diagnosi specifica spesso richiede un esame istologico.

La presenza, distribuzione e tipo della papille tegumentali potrebbero essere utilizzati come caratteri distintivi delle diverse specie. La loro accurata osservazione può essere effettuata soltanto su campioni fissati adeguatamente e con l'utilizzo del microscopio elettronico.

L'attenta disamina dei criteri di classificazione tassonomica dei paramfistomidi su esposta, fa capire quanto l'utilizzo di queste chiavi morfometriche sia complesso, a volte indaginoso e soprattutto richieda competenze e attrezzature specifiche, come ad esempio un microscopio elettronico (Horak, 1971; Mage et al., 2002). Forse proprio per questo motivo in molti lavori viene omessa la classificazione di specie.

Per questi motivi alcuni autori si chiedono se le differenze morfologiche osservate possano giustificare in alcuni casi la presenza di specie separate o magari debbano essere riconsiderate insieme alla biologia ed alla genetica degli stessi parassiti in maniera da poter determinare una classificazione più fedele ed organica.

A questo proposito, diversi studi condotti sui Platelmini hanno mostrato come le sequenze del DNA appartenente regione ribosomiale dell'ITS (Internal Transcribed spacers; ITS-1 and ITS-2) of ribosomal DNA (rDNA) siano degli ottimi marker per questa famiglia di parassiti (Gasser and Chilton, 1995; Huang et al., 2004).

Nello specifico la sequenza dell'ITS-2 è stata utilizzata per discriminare *F. hepatica* da *F. gigantica* (Adlard et al., 1993; Agatsuma et al., 2000), *Schistosoma bovis* da *S.*

*haematobium* (Barber et al., 2000) e recentemente da Rinaldi et al. (2005) che ha identificato *Calicophoron daubneyi* nel Sud Italia.

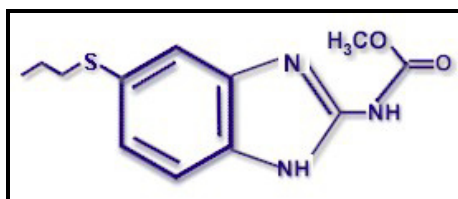
Nel futuro quindi l'esatta tassonomia di questi parassiti potrà essere determinata in modo più sicuro ed oggettivo attraverso approcci biomolecolari.

### 3. GENERALITA' SUI FARMACI UTILIZZATI NEI TRIALS

#### 3.1. Generalità sull'albendazolo (benzimidazolico)

##### Chimica

Tutti i benzimidazolici (BDZ) hanno in comune una stessa struttura centrale (1,2-diaminobenzene). Gli altri composti differiscono dal tiabendazolo per una sostituzione sul carbonio 5 dell'anello benzenico. L'albendazolo è una polvere bianca cristallina insolubile in acqua e solubile in alcool. La formula di struttura dell'albendazolo è indicata nella figura sottostante.



Formula di struttura dell'albendazolo

##### Farmacocinetica

L'albendazolo è scarsamente assorbito dal tubo gastroenterico degli animali, forse a causa della sua limitata idrosolubilità. L'assorbimento, per quanto possibile, è comunque rapido e i massimi livelli plasmatici vengono raggiunti entro 6-30 ore dalla sua somministrazione. I livelli plasmatici in genere non superano mai l'1% della dose somministrata, indipendente dalla formulazione orale impiegata (sospensioni in pasta, granuli o boli). L'albendazolo viene assorbito in quantità nettamente superiori rispetto agli altri benzimidazolici poiché il 47% della dose somministrata si ritrova nelle urine nei 9 giorni successivi (28% entro le prime 4 ore). La permanenza dei BDZ nel cavo ruminale, piuttosto che un loro passaggio diretto nell'abomaso tramite la doccia esofagea, produce livelli plasmatici più elevati e ne aumenta conseguentemente l'attività antielmintica (Prichard e Hennessy, 1981). I principali metaboliti dell'albendazolo vengono escreti prevalentemente per via



urinaria, il sulfossido e il sulfone, vengono escreti prevalentemente per via urinaria. Piccole quantità di BDZ sono escrete per periodi anche di una settimana e mezzo dopo la loro somministrazione. I loro residui pervengono entro 2 giorni ai limiti della loro rilevabilità (0,05 mg/kg) nella maggior parte dei tessuti degli animali trattati, ma quote residuali nel fegato sono ancora rinvenibili, con metodi radioattivi, a distanza di due settimane dalla somministrazione, in misura pari o inferiore a 0,3 µg/g di tessuto. Per tali motivi è necessario fissare un congruo tempo di sospensione pre-macellazione per le carni degli animali trattati nonché per il latte destinato al consumo umano.

### **Meccanismo d'azione**

Il principale meccanismo d'azione dei BZD si estrinseca nel legame con la tubulina del nematode ed in particolare con la forma dimera che, a sua volta impedisce la successiva polimerizzazione nella fase di assemblaggio dei microtubuli. Gli effetti precedentemente attribuiti ai BDZ, quale l'inibizione della fumarato reduttasi, sono ritenuti secondari al danno sui microtubuli, essenziali per la secrezione di numerosi enzimi, anche se non si può escludere che i BDZ possano avere altri meccanismi d'azione del tutto indipendenti dall'interazione con il sistema microtubulare.

Alla temperatura corporea dei mammiferi i BDZ hanno affinità molto più elevata per la tubulina dei nematodi (rispetto a quella delle cellule dell'ospite NdT), espressa come velocità di dissociazione del complesso BZD-tubulina, e questo motiva la loro selettività d'azione. La tubulina dei nematodi benzimidazolo-resistenti denuncia affinità ridotta per i BZD. Questi parassiti mostrano infatti una modificazione dell'isotipo beta-tubulina verso una forma a più bassa affinità per i BDZ, dovuta forse ad una semplice sostituzione di un paio di basi nella sequenza del DNA.

### **Maneggevolezza e tossicità**

In linea di massima i BZD sono molto ben tollerati dagli animali domestici e selvatici risultando esenti da effetti collaterali anche in soggetti giovani, ammalati o debilitati, se somministrati a corretti dosaggi terapeutici. Per quanto variabile, anche la tollerabilità a dosi elevate appare di solito eccellente. Somministrazioni singole di albendazolo (300mg/kg) possono risultare letali nel bovino, al pari di quanto si verifica occasionalmente con dosaggi di 200 mg/kg nelle pecore.

## Controindicazioni

Per evitare la presenza di quote residuali di BDZ nei tessuti e nel latte destinati all'alimentazione umana si raccomanda una rigorosa osservazione dei tempi di sospensione prima della macellazione o dell'utilizzo del latte degli animali trattati. La maggiore controindicazione all'uso dei BDZ modificati riguarda la loro somministrazione alle pecore durante le fasi iniziali della gravidanza. Effetti embriotossici e teratogeni sono stati attribuiti alla somministrazione di albendazolo a dosi singole di 10 mg/kg nell'ovino. Nel bovino, per quanto non esistano indicazioni di embriotossicità o di attività teratogenetica, è stata invece segnalata una minore fertilità (61% nei trattati rispetto al 72% nei controlli) conseguente a trattamenti con albendazolo (Theodorides et al. 1993).

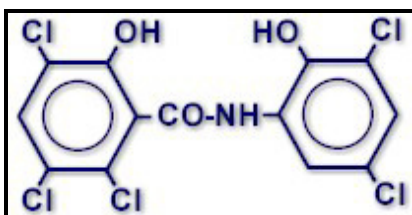
## Dosaggi e somministrazioni

I benzimidazolici vengono somministrati solo per via orale come paste o sospensioni per boli o come polveri o granuli da aggiungere all'alimento o da incorporare in un supporto alimentare salino. In alcuni Paesi (soprattutto il Sud-Africa), l'albendazolo viene somministrato ad ovine e bovine sotto forma di boli a ritenzione gastrica, a lento rilascio o a rilascio pulsorio.

### 3.2. Generalità sull'ossiclozanide

#### Chimica

L'ossiclozanide è stata introdotta nella terapia della distomatosi nel 1966 (Adams, 1999). Si tratta di una sostanza cristallina bianca, contraddistinta dalla denominazione chimica 3,3', 5,5', 6-pentacloro-2'-idrossisalicilamide e dalla formula di struttura riportata nella figura seguente. Praticamente insolubile in acqua viene allestita commercialmente come sospensione acquosa di particelle di 10 µm da somministrare per via orale in ovini e bovini.



Formula di struttura dell'ossiclozanide.

### **Farmacocinetica**

Ad assorbimento avvenuto, l'ossiclozanide risulta conseguire concentrazioni più elevate nel fegato, nel rene e nell'intestino per essere poi eliminata con la bile in forma di glucuronide attivo. L'emivita della sua fase di eliminazione è 4-6 giorni.

### **Meccanismo d'azione**

Il meccanismo d'azione dell'ossiclozanide si esplica a livello dei meccanismi di trasporto energetico che vengono alterati inducendo nel parassita uno stato di paralisi tonica irreversibile. Al pari di altre salicilanilidi e dei fenoli modificati, l'ossiclozanide esercita effetti di disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa.

### **Spettro di attività antielmintica**

Questi farmaci, che interessano in vivo solo le forme adulte, risultano inattivi contro i vermi immaturi per l'elevato legame che contraggono con le proteine del sangue, con le quali sono a contatto, nel parenchima epatico, i distomi immaturi (O'Brien, 1970). L'efficacia dell'ossiclozanide sui distomi adulti a localizzazione epatica è pressochè analoga a quella del CC14, dell'esacloroetano e dell'esaclorofene, sui quali il farmaco offre il vantaggio di minore tossicità. L'ossiclozanide esercita invece scarsa attività contro il parassita ruminale *Paramphistomum* a meno che non vengano fatti due trattamenti (ciascuno di 18,7 mg/kg) intervallati da 3 giorni, ed è caratterizzata da un indice chemioterapico pari a circa 4.

### **Maneggevolezza e tossicità**

Alle dosi terapeutiche può però essere usata in animali debilitati e gravidi senza produrre effetti collaterali. Il trattamento con il farmaco non richiede alcuna modificazione dell'alimentazione dei soggetti in corso di terapia. In diversi paesi l'ossiclozanide è commercializzata in associazione al levamisolo o al tetramisolo per il trattamento di infestioni miste sostenute da nematodi e *F. hepatica*. La massima dose tollerata nell'ovino e nel bovino è di circa 60 mg/kg. Per contro, nel coniglio questo dosaggio produce infiammazione catarrale della mucosa gastrica entro i primi due giorni di trattamento e degenerazione grassa del fegato dal 3° al 7° giorno dopo la somministrazione. La somministrazione di ossiclozanide alla dose di 25 mg può indurre nei ruminanti effetti collaterali di secondaria importanza, quali un rammollimento delle feci, un'aumentata frequenza di defecazione, una lieve

depressione del sensorio ma non esiti letali in animali che non siano colpiti da grave epatosi cronica.

### **Dosaggio e somministrazione**

La dose preconizzata nell'ovino e nel bovino è di 15 mg/kg. In molti Paesi l'ossiclozanide è l'unico distomicida usato per la terapia bovina, poiché le sue quote residuali sono molto basse ed hanno consentito di fissare tempi di sospensione brevi per gli animali destinati alla macellazione e addirittura il tempo zero per il latte (Adams, 1999).

## 4. MATERIALI E METODI

### 4.1. Tecniche copromicroscopiche utilizzate

Tutti i campioni di feci venivano prelevati direttamente dall'ampolla rettale di ogni soggetto, posti all'interno di un contenitore di plastica monouso su cui venivano riportati i dati identificativi dell'animale; i contenitori venivano quindi riposti in una borsa frigo e recapitati in laboratorio entro 24 ore dal prelievo.

Le analisi qualitative per la verifica della presenza o meno delle forme di propagazione del parassita ricercato venivano effettuate mediante la sedimentazione e successiva flottazione in una soluzione di solfato di Zn (p.s. 1350) su pools di feci derivanti da almeno 5 capi (Genchi et al., 2010).

Le fasi della tecnica utilizzata erano le seguenti:

1. si metteva in un colino una noce di feci (da 5 a 10 g) per scioglierle con l'acqua corrente a filo fino a riempire un calice di 500 ml;
2. si lasciava sedimentare per circa venti minuti;
3. si eliminava il surnatante e si versavano 1-2 ml di sedimento in una provetta che veniva riempita successivamente con una soluzione pesante di Solfato di Zinco 1350 fino a formare un menisco positivo;
4. si poggiava sulla provetta un coprioggetto 24x24 e si lasciava centrifugare per dieci minuti a 2000 rpm;
5. si poggiava il vetrino coprioggetto su un portaoggetto e si esaminava al microscopio.

Le analisi quali-quantitative venivano effettuate tramite la tecnica del Flotac<sup>®</sup> (foto n°18) con una soluzione pesante di Solfato di Zinco (p.s. 1350).

Le fasi della tecnica utilizzata erano le seguenti:

1. si pesavano in un barattolo 10 g di feci e si aggiungeva acqua di fonte fino a 300 ml, (rapporto di diluizione 1:30); nel caso in cui le feci fossero state insufficienti, si utilizzava il materiale a disposizione e si aggiungeva acqua fino a ottenere lo stesso rapporto;

2. si omogeneizzava accuratamente la sospensione, mediante l'utilizzo di un frullatore ad immersione;
3. si filtrava la sospensione con un filtro a maglie da 250  $\mu\text{m}$  e si trasferiva nell'altro barattolo;
4. si mescolava accuratamente e si trasferivano 6 ml della sospensione filtrata in una provetta; la capienza di una camera di flottazione del FLOTAC<sup>®</sup>100 è di 5 ml, in questo modo ne veniva garantito l'adeguato riempimento;
5. si centrifugava la provetta per 3 minuti a 1500 rpm;
6. dopo centrifugazione, si versava il surnatante lasciando solo il sedimento (pellet) nella provetta;
7. si aggiungeva al pellet la soluzione di Solfato di Zinco 1350, ripristinando il volume iniziale di 6 ml;
8. successivamente si utilizzava la tecnica "double" che prevede l'esame di due campioni diversi con l'utilizzo della stessa soluzione flottante in entrambe le camere;
9. dopo accurata omogeneizzazione della sospensione si riempiva la camera di flottazione del FLOTAC<sup>®</sup>;
10. si chiudeva il FLOTAC<sup>®</sup> e si centrifugava per 5 minuti a 1000 rpm;
11. dopo centrifugazione, si traslava la parte apicale della sospensione, si esaminava il FLOTAC<sup>®</sup> al microscopio ad ingrandimento 10X e si contavano le uova nei due reticoli di lettura. Per ottenere il numero di UPG (uova per grammo di feci), si moltiplicava il numero delle uova contate in una camera per 6.

## 4.2. RILIEVI EPIDEMIOLOGICI OVINI

### Riscontri copro microscopici

Per la valutazione della diffusione delle trematodosi da *F. hepatica*, *D. dendriticum* e paramfistomidi si è proceduto, nell'arco del triennio 2011-2013, tramite la collaborazione dei Veterinari dell'Associazione Regionale Allevatori della Sardegna (ARAS), al monitoraggio copromicroscopico di 381 aziende di ovini da latte di razza sarda di tutte le quattro province storiche della Sardegna (n°22 Cagliari, n°241 Sassari, n°69 Nuoro ed n°49 Oristano).

Per ogni gregge si provvedeva a prelevare 15 campioni fecali di pecore adulte (> di 3 anni); da questi campioni venivano allestiti 3 pools di feci che venivano analizzati tramite la metodica di sedimentazione+flottazione e 121 di questi anche con la tecnica Flotac®.

### Riscontri al mattatoio

Sempre nello stesso triennio si è proceduto all'esame parassitologico diretto del fegato e del rumine e reticolo di 356 ovini adulti di razza sarda regolarmente macellati presso mattatoi del nord Sardegna.

Gli organi separati dalla carcassa venivano, nel caso del fegato, trasportati in apposita cassetta frigo presso il laboratorio di parassitologia del Dipartimento, mentre i prestomaci venivano accuratamente ispezionati.

Per verificare la presenza di distomi epatici si procedeva all'esame del fegato e della cistifellea e alla registrazione delle lesioni macroscopicamente evidenti. Successivamente, dopo aver inciso la cistifellea, il fegato veniva tagliato lungo i grandi e piccoli dotti biliari e le vene epatiche per la ricerca dei parassiti.

In seguito il fegato veniva tagliato in fette sottili di 0,5-1,0 cm di larghezza, e posto in acqua tiepida.

I parassiti che migravano in acqua venivano recuperati mediante l'uso di un setaccio e in seguito trasferiti in una piastra di Petri con soluzione salina per la loro conta in base alle linee guida della "World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology" (WAAVP) (Wood et al., 1995). Le cariche parassitarie riscontrate venivano stratificate nelle seguenti due classi: < a 50 esemplari e ≥ a 50 esemplari.

Il ruminale e il reticolo venivano ispezionati al loro interno direttamente presso la tripperia del mattatoio dopo aver proceduto alla loro apertura ed eliminazione del contenuto; si procedeva quindi al lavaggio delle loro pareti per allontanare i frustoli vegetali ancora presenti e quindi si contavano i paramfistomidi eventualmente presenti.

### **4.3. QUESTIONARIO SUL CONTROLLO DELLA DICROCELIOSI OVINA**

Il questionario elaborato prevede 10 domande riportabili a tre diverse sezioni:

- Prima sezione: sono riportati quesiti sul numero e consistenza delle aziende seguite dal veterinario “compilatore”; sul tasso di prevalenza dell’infestione che lui ritiene presente nei greggi da lui seguiti; sul parere che hanno gli allevatori sull’importanza della dicroceliosi.
- Seconda sezione: sono riportati quesiti sulle modalità diagnostiche seguite;
- Terza sezione: si riportano quesiti sulle basi su cui si effettuano i trattamenti e le modalità di attuazione degli stessi (scelta del principio attivo, protocollo terapeutico utilizzato e verifica dell’efficacia dello stesso).

Non si è voluto procedere all’allestimento di un questionario più articolato e quindi più informativo, per evitare di “stancare” il veterinario compilatore ed ottenere quindi delle risposte meno affidabili. I questionari compilati completamente sono risultati 39 nel periodo maggio-luglio 2012. Le domande contenute nel questionario venivano poste al veterinario sempre direttamente dalla stessa persona che le riportava materialmente sul supporto cartaceo, onde uniformare la presentazione delle stesse. Si è optato per questa soluzione, in quanto la consegna del questionario al Veterinario avrebbe potuto consentire allo stesso l’esame dei foglietti illustrativi o di altro materiale divulgativo e/o scientifico dei vari farmaci in cui erano riportate le modalità di trattamento e i dosaggi specifici per il *D. dendriticum*, falsando evidentemente quello che effettivamente era successo sul campo e rendendo quindi meno attendibile il risultato finale.



#### 4.4. TRIALS DI CAMPO OVINI

##### **Trial di campo per verificare l'efficacia dell'albendazolo nei confronti della dicroceliosi in gregge con sospetto di farmacoresistenza**

La prova si è svolta in due tempi, la prima parte da dicembre 2012 a gennaio 2013 e la seconda da marzo ad aprile 2013 in un allevamento di 400 ovini di razza sarda in agro del comune di Usini (SS), in cui analisi coprologiche attuate dal veterinario aziendale avevano fatto sospettare la scarsa efficacia di un precedente trattamento antiparassitario attuato nei confronti della dicroceliosi.

La prima parte dell'indagine è stata condotta su un totale di 138 pecore, sulle quali sono state effettuate delle analisi quali-quantitative mediante l'utilizzo della metodica FLOTAC<sup>®</sup>, per valutare la carica parassitaria nei confronti di *D. dendriticum*; sono state quindi selezionate 81 pecore che presentavano una carica superiore a 100 UPG. Gli ovini, tutti di età adulta, sono stati successivamente divisi in tre gruppi di 27 elementi ciascuno, in proporzioni uniformi per cariche parassitarie:

- 1) GRUPPO ROSSO: trattato con Valbazen 1,9%<sup>®</sup>, al dosaggio di 11 ml di sospensione/20 kg P.V. (10,45 mg/kg) in un'unica somministrazione;
- 2) GRUPPO BLU: trattato con Valbazen 1,9%<sup>®</sup>, al dosaggio di 11 ml di sospensione/20 kg P.V. (10,45 mg/kg) ripetuto a distanza di una settimana;
- 3) GRUPPO VERDE: gruppo controllo non trattato.

La seconda parte della prova è stata condotta su un totale di 63 pecore, delle quali, dopo le analisi coprologiche mediante l'utilizzo della metodica FLOTAC<sup>®</sup>, ne sono state selezionate 43 che presentavano una carica superiore a 70 UPG. Gli ovini, tutti di età adulta, sono stati successivamente divisi in tre gruppi, in proporzioni uniformi per cariche parassitarie:

- 1) GRUPPO BLU: 20 pecore trattate con Valbazen 10%<sup>®</sup>, al dosaggio di 2 ml di sospensione/10 kg P.V. (20 mg/kg) in un'unica somministrazione;
- 2) GRUPPO ROSSO: 10 pecore trattate con Valbazen 1,9%<sup>®</sup>, al dosaggio di 22 ml di sospensione/20 kg P.V. (20,9 mg/kg) in un'unica somministrazione;
- 3) GRUPPO VERDE: 13 pecore non trattate.

Tutte le pecore sono state tenute nelle stesse condizioni dall'inizio alla fine della prova. Tutti gli animali venivano osservati per accertarsi dell'effettiva ingestione del farmaco e per il rilevamento di eventuali reazioni avverse. I prelievi individuali di feci sono stati effettuati al giorno G-7 (arruolamento), a G 0 (trattamento), G 7, G 14, G 21 e G 28 (per la prima prova non è stato possibile procedere al prelievo del G 21). L'analisi statistica delle medie di UPG nei gruppi di trattamento, effettuata tramite il test non parametrico di Mann-Whitney, non ha rilevato differenze statisticamente significative tra i tre gruppi monitorati a G 0.

### **Trial di campo per la valutazione dei protocolli terapeutici con albendazolo nei confronti della dicroceliosi**

Per procedere ad una valutazione dell'efficacia di differenti protocolli terapeutici nei confronti della dicroceliosi ovina attraverso l'uso dell'albendazolo, sono stati previsti i protocolli di seguito riportati derivanti dai suggerimenti contenuti nei foglietti illustrativi dei prodotti utilizzati, dalle indicazioni scaturite dall'elaborazione dei dati del questionario compilato dai veterinari che operano sul territorio e da considerazioni derivanti dall'attuazione di pregresse analisi attuate in occasione di precedenti trattamenti, quale ad esempio l'episodio di probabile farmaco resistenza all'albendazolo riportato anche nella presente dissertazione.

In particolare sono state utilizzate formulazioni di albendazolo micronizzato a diverse concentrazioni corrispondenti a due prodotti commerciali che, da dati riportati da Scala et al. (1999), dall'esame del questionario e da informazioni acquisite da allevatori, risultano essere le più utilizzate in Sardegna nella terapia della dicroceliosi ovina:

1) Valbazen 1,9%<sup>®</sup> (Zoetis Italia), 1,9 gr di albendazolo micronizzato + eccipienti ed acqua distillata q.b. a 100 ml;

2) Valbazen 10%<sup>®</sup> (Zoetis Italia), 10 gr di albendazolo micronizzato + eccipienti ed acqua distillata q.b. a 100 ml.

I prodotti utilizzati sono sospensioni per uso orale e le cui indicazioni terapeutiche indicate nel foglietto illustrativo suggeriscono per il trattamento della dicroceliosi ovina la somministrazione di 8-11 ml di sospensione per 20 Kg p.v. per il Valbazen

1,9%<sup>®</sup>, pari a 10,45 mg/kg p.v. di albendazolo micronizzato e di 3-4 ml di sospensione per 40 Kg p.v. per il Valbazen 10%<sup>®</sup>, pari a 20 mg/kg p.v. di albendazolo micronizzato; entrambi questi prodotti, secondo la ditta produttrice, dovrebbero essere ripetuti a distanza di una settimana nel corso di terapia nei confronti di *D. dendriticum*.

I protocolli utilizzati sono stati i seguenti, così nominati:

Protocollo P 1 – Prevedeva la somministrazione 14 giorni prima del previsto trattamento con l'albendazolo (Valbazen 1,9%<sup>®</sup>) di un trattamento con moxidectina alla dose di 0,2 mg/Kg p.v. (Cydectin<sup>®</sup> 0,1% soluzione orale della Zoetis Italia) allo scopo di eliminare i nematodi gastro-intestinali eventualmente presenti che avrebbero potuto interferire con l'efficacia del trattamento successivo nei confronti della dirosceliosi attuato con l'albendazolo alla dose di 10,45 mg/kg p.v., ripetuto dopo una settimana (Valbazen 1,9%<sup>®</sup>). In questo caso i controlli copromicroscopici atti a valutare l'efficacia nei confronti di *D. dendriticum* sono stati effettuati a G -7, G 0, G 7 e G 14.

Protocollo P 2 – Prevedeva le modalità indicate nel foglietto illustrativo del prodotto usato, Valbazen 1,9%<sup>®</sup>, cioè la somministrazione di albendazolo alla dose di 10,45 mg/kg p.v., pari a 11 ml della sospensione ogni 20 kg p.v., ripetuto dopo una settimana. I controlli copromicroscopici atti a valutare l'efficacia nei confronti di *D. dendriticum* sono stati effettuati a G -7, G 0, G 14, G 21 e G 28.

Protocollo P 3 - Prevedeva le modalità indicate nel foglietto illustrativo del prodotto usato, Valbazen 10%<sup>®</sup>, cioè la somministrazione di albendazolo alla dose di 10 mg/kg p.v., pari a 1 ml della sospensione ogni 10 kg p.v., ripetuto dopo una settimana. I controlli copromicroscopici atti a valutare l'efficacia nei confronti di *D. dendriticum* sono stati effettuati a G -7, G 0, G 14, G 21 e G 28.

Protocollo P 4 - Prevedeva un dosaggio doppio rispetto alle modalità indicate nel foglietto illustrativo del prodotto Valbazen 10%<sup>®</sup>, cioè la somministrazione di albendazolo alla dose di 20 mg/kg p.v., pari a 2 ml della sospensione ogni 10 kg p.v. in un'unica somministrazione. I controlli copromicroscopici atti a valutare l'efficacia nei confronti di *D. dendriticum* sono stati effettuati a G -7, G 0, G 14, G 21 e G 28.

Tali protocolli sono stati effettuati nel periodo agosto-ottobre del 2013 in sette greggi di ovini di razza sarda, tutti allevati allo stato semibrado, di tutte le province della Sardegna, denominati: All. A, All. B, All. C, All. D, All. E, All. F.

In particolare ogni protocollo prevedeva l'arruolamento di 10-15 soggetti controllo e 10-15 soggetti trattati per ogni tipo di trattamento.

In totale sono stati effettuati 12 trials così distribuiti:

- n°5 P1 – All. A, All. B, All. C, All. D, All. E;
- n°2 P2 – All. D, All. G
- n°3 P3 – All. D, All. E, All. F;
- n°2 P4 – All. D, All. F.

### **Trial di campo per verificare l'efficacia dell'ossiclozanide nei confronti della paramfistomosi ovina**

Il trial si è svolto nel periodo di novembre-dicembre 2012 a L'Aquila, in un'azienda di pecore di razza Comisana con infestione naturale da paramfistomidi rilevata precedentemente al nostro intervento tramite analisi copro microscopiche e con rilievi autoptici eseguiti su capi naturalmente deceduti.

L'indagine è stata condotta su un totale di 120 pecore, sulle quali sono state effettuate delle analisi quali-quantitative mediante l'utilizzo della metodica FLOTAC<sup>®</sup>, per valutare le UPG nei confronti dei paramfistomidi; gli ovini, tutti di età superiore ai 3 anni, sono stati successivamente divisi in tre gruppi di 40 elementi ciascuno, in proporzioni uniformi per cariche parassitarie valutate su 200 soggetti al giorno - 7:

- 4) GRUPPO ROSSO: trattato con un'associazione di ossiclozanide+levamisolo (Toloxan<sup>®</sup>-Fatro spa) al dosaggio di 0,5 ml di sospensione/kg P.V. in un'unica somministrazione pari a 15 mg/kg p.v. di ossiclozanide+7,5 mg/kg p.v. di levamisolo;
- 5) GRUPPO BLU: trattato con con un'associazione di ossiclozanide+levamisolo (Toloxan<sup>®</sup>-Fatro spa) al dosaggio di 0,75 ml di sospensione/ kg P.V. in un

unica somministrazione, pari a 22,5 mg/kg p.v. di ossiclozanide+11,25 mg/kg p.v. di levamisolo;

6) GRUPPO VERDE: gruppo controllo non trattato.

Non è stato possibile utilizzare un prodotto a base esclusivamente di ossiclozanide, in quanto lo stesso non risulta attualmente reperibile in commercio in Italia.

Tutte le pecore sono state tenute nelle stesse condizioni dall'inizio alla fine della prova. Tutti gli animali venivano osservati per accertarsi dell'effettiva ingestione del farmaco e per il rilevamento di eventuali reazioni avverse. I prelievi individuali di feci per il calcolo dell'efficacia dei trattamenti attuati sono stati effettuati al giorno a G 0 (Trattamento), G 14 e G 28.

#### **4.5. RILIEVI EPIDEMIOLOGICI BOVINI**

##### **Riscontri copromicroscopici**

Per la valutazione della diffusione delle trematodosi da *F. hepatica* e *D. dendriticum* si è proceduto, nel corso del triennio 2011-2011 al monitoraggio copromicroscopico di pools fecali provenienti da 59 allevamenti di bovini allevati in Sardegna allo stato brado/semibrado (linea vacca-vitello), di varie razze (Sarda, Bruna, Limousine, Charolaise e loro incroci) (foto n°19) tramite sedimentazione e successiva flottazione con una soluzione di solfato di Zn in centrifuga, secondo le modalità sopra riportate.

##### **Riscontri al mattatoio**

Nel triennio 2011-2013, presso mattatoi del nord Sardegna, sono stati effettuati esami parassitologici diretti nel corso della visita post-macellazione per la ricerca di esemplari di *D. dendriticum* e di *F. hepatica* sui fegati di 1.328 bovini allevati allo stato brado/semibrado (linea vacca-vitello) delle stesse razze monitorate coprologicamente prima riportate e nella maggior parte dei casi di età inferiore ai 2 anni. L'esame del fegato veniva effettuato secondo il REGOLAMENTO (CE) N. 854/2004 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 29 aprile 2004 che stabilisce norme specifiche per l'organizzazione di controlli ufficiali sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano. In particolare noi abbiamo applicato in tutti i fegati esaminati le norme che prevedevano l'applicazione delle manualità riservate ai bovini superiori ai 6 mesi che comprendevano l'ispezione visiva e la

palpazione del fegato e dei linfonodi periportal, nonché l'incisione del fegato sulla faccia gastrica e alla base del lobo caudato per l'esame dei dotti biliari.

Su 505 dei bovini controllati è stato inoltre possibile effettuare anche un'ispezione post-macellazione del ruminale e del reticolo volta alla ricerca di esemplari maturi di paramfistomidi, secondo le modalità già indicate in precedenza per l'ovino.

Per la valutazione delle cariche parassitarie presenti di *D. dendriticum* si procedeva al controllo di 67 fegati positivi presso il nostro laboratorio tramite la metodica riportata per gli ovini. Le cariche parassitarie riscontrate venivano registrate all'interno di tali range: per *D. dendriticum* classe  $\leq$  a 100 e classe  $>$  di 100 esemplari; per i paramfistomidi sono state invece previste le classi  $\leq$  a 50, fra 50 e 100 e  $>$  di 100 esemplari; per *F. hepatica* si è proceduto alla conta diretta dei parassiti in localizzazione.

#### **4.6. TRIALS DI CAMPO PARAMFISTOMOSI E DICROCELIOSI BOVINA**

Sono inoltre state eseguite due prove terapeutiche di campo: una in bovini naturalmente infestati da paramfistomidi e l'altra in animali naturalmente infestati da *D. dendriticum*.

Per la prova terapeutica di campo sui paramfistomidi sono stati selezionati 27 bovini di razza Bruno/Sarda di età variabile da 9 mesi a 10 anni, naturalmente infestati da paramfistomidi allevati allo stato brado/semibrado in provincia di Sassari.

I bovini, in base ai risultati dell'indagine copromicroscopica attuata con la tecnica del Flotac<sup>®</sup> con una soluzione di solfato di Zn (p.s. 1350) a G 0, sono stati suddivisi in due gruppi: Gruppo A, 14 bovini trattati per via orale con una sospensione alla dose di 15 mg/kg peso vivo di albendazolo (pari a 15ml/100 kg pv di Valbazen 10%<sup>®</sup>-Pfizer); Gruppo O, 13 bovini trattati per os con sospensione di un'associazione di ossiclozanide/levamisolo, con una dose rispettivamente di 15 mg/Kg e 7,5mg/Kg (pari a 25 ml/50 Kg pv di Toloxan<sup>®</sup>-Intervet).

Invece per la prova terapeutica di campo su *D. dendriticum* sono stati utilizzati 12 bovini di razza Bruno/Sarda di età variabile da 9 mesi a 10 anni, naturalmente infestati da *D. dendriticum* e allevati allo stato brado/semibrado in provincia di Sassari. I bovini sono stati trattati a G 0 con una sospensione alla dose di 15 mg/kg peso vivo di albendazolo (pari a 15ml/100kg di Valbazen 10%<sup>®</sup>-Pfizer).

#### 4.7. CALCOLO EFFICACIA TRATTAMENTI ANTIPARASSITARI

Il livello di efficacia delle molecole somministrate è stato valutato applicando la seguente formula per il calcolo della riduzione delle uova per grammo di feci (FECR%= Faecal Egg Count Reduction), così come indicato da Coles et al. (1992):

$$\% \text{ di efficacia} =$$

$$\left( \frac{\text{media aritmetica UPG Giorno 0} - \text{media aritmetica UPG Giorno post-trattamento}}{\text{media aritmetica UPG Giorno 0}} \right) \times 100$$

Le medie di UPG sono state confrontate tramite il test non parametrico di Mann Whitney; in tutti i confronti effettuati i valori di significatività di  $P \leq 0,05$  sono stati interpretati come indice di differenze significative per i test utilizzati.

I dati ottenuti venivano implementati su un foglio elettronico (Excel-Microsoft) e quindi elaborati tramite il software MINITAB Release for Windows 12.1 ed EpiInfo vers. 6.04.

#### 4.8. PROVA TASSONOMICA BIOMOLECOLARE PARAMFISTOMIDI

Nel periodo compreso fra Maggio 2012 ed Aprile 2013, sono stati raccolti dei trematodi adulti dal ruminante e dal reticolo di ruminanti naturalmente infestati macellati in diversi mattatoi dell'isola. In particolare sono stati raccolti e processati un totale di 50 parassiti, provenienti da bovini (n°42) ed ovini (n°8).

I trematodi venivano lavati con soluzione fisiologica e direttamente processati e/o stoccati a  $-80^{\circ}\text{C}$ ; altri, provenienti dallo stesso animale, venivano conservati in una soluzione di etanolo al 70% per l'identificazione morfologica.

20 esemplari di paramfistomidi provenienti dalla collezione Parassitologica del Settore di Parassitologia relativi a prelievi condotti negli ultimi 30 anni, già fissati in alcool o formalina e classificati come *Paramphistomum* spp., sono stati inclusi nello studio, per poter avere anche una visione retrospettiva della situazione tassonomica in Sardegna.

Per l'indagine biomolecolare sono stati quindi selezionati 18 parassiti adulti, sia isolati recentemente che provenienti dalla collezione storica, classificati

morfologicamente in precedenza come *Paramphistomum* spp., dai quali si è proceduto all'estrazione del DNA. I dati di ciascun parassita, quali anno di isolamento, ospite, classificazione morfologica, materiale utilizzato per la conservazione sono stati riportati nella tabella 1. Inoltre per completare l'indagine, 12 trematodi adulti provenienti dalla Regione di Buenos Aires, Argentina, classificati morfologicamente e sequenziati (GenBank: HM209067.1; HM209064.1) come *Paramphistomum leydeni*, isolati sia in bovini che ovini, sono stati esaminati e processati con le metodiche già descritte e considerati come olotipo della specie in oggetto, le cui caratteristiche morfologiche e biomolecolari sono state quindi comparate con i parassiti campionati in Sardegna.

Per l'estrazione del DNA genomico (dai parassiti adulti e dalle uova) è stato utilizzato un kit di tipo commerciale a colonnine (High Pure PCR Template Preparation Kit della ROCHE). Si è poi proceduto all'amplificazione mediante PCR della sequenza della regione Internal Transcribed Spacers (ITS-2+) del DNA ribosomiale (rDNA) che comprende anche le regioni 5.8S e 28S utilizzando i primers ITS-2F (5' TGT GTC GAT GAA GAG CGC AG 3') ed ITS-2R (5' TGG TTA GTT TCT TTT CCT CCG C 3') come descritto da Itagaki et al., 2003. La lunghezza attesa degli ampliconi per il risultato della PCR è di circa 428 bp. In seguito si provvedeva alla purificazione degli amplificati e all'invio presso un laboratorio esterno per il successivo sequenziamento (MWG, Eurofins). Le sequenze ottenute, venivano appaiate ed analizzate mediante il software Mega v5.1 e online mediante BLAST software per confrontarle con le sequenze dell'NCBI depositate in rete.



## 5. RISULTATI

### 5.1. RILIEVI EPIDEMIOLOGICI OVINI

#### Riscontri copromicroscopici

Le indagini copromicroscopiche condotte sulle 381 greggi atte a valutare la diffusione in Sardegna delle tre trematodosi prese in considerazione hanno consentito di rilevare in totale 146 greggi, pari al 38,32% di quelli esaminati con positività a uova di trematodi, e più specificatamente alle parassitosi di seguito riportate con le rispettive prevalenze:

dicrocoeliosi – 22,04% (n°84);

paramfistomosi – 13,91% (n°53);

fasciolosi – 2,36% (n°9).

I tassi di prevalenza riscontrati per le diverse parassitosi differivano significativamente tra loro ( $\chi^2$  con due gradi di libertà= 66,92;  $P < 0,0001$ ). Tali infestioni risultavano nell'84,93% dei casi monospecifiche (n°124), nell'11,64% bispecifiche (n°17) e nel 5% trispecifiche (n°5); le percentuali e il tipo di associazioni bispecifiche riscontrate erano le seguenti:

dicrocoeliosi + paramfistomosi = 9,58% (n°14);

dicrocoeliosi + fasciolosi = 1,36% (n°2);

paramfistomosi + fasciolosi = 0,68% (n°1).

I dati relativi alle prevalenze totali stratificate per anno di prelevamento sono riportati nella tabella n°2.

L'elaborazione statistica dei dati riferiti all'anno di prelevamento dei campioni esaminati riportati nella tabella precedente, ha rilevato delle differenze statisticamente significative per le prevalenze riscontrate nei differenti anni esclusivamente nel caso della dicrocoeliosi ( $\chi^2$  con due gradi libertà= 25,5;  $P < 0,0001$ ).

Nella tabella n°3 sono riportati i tassi di prevalenza stratificati per le quattro province "storiche" della Sardegna. La stratificazione dei dati per le quattro province

“storiche” della Sardegna non ha evidenziato per nessuna delle tre parassitosi monitorate delle differenze significative delle prevalenze ( $P < 0,001$ ).

Nelle 121 greggi in cui è stata effettuata un’analisi coprologica quantitativa tramite la tecnica Flotac<sup>®</sup> sui pools di feci analizzati, si sono rilevati per *D. dendriticum* livelli medi di 61,4 ( $\pm 105,5$ ) UPG, con l’8,7% dei pools positivi con valori  $>$  a 150 UPG, cioè ritenuti da Ambrosi (1995) per la paramfistomosi ovina indicatori di situazione a rischio zootecnico. Per ciò che concerne invece le uova di paramfistomidi i livelli medi erano di 60,3 ( $\pm 107,9$ ) UPG, con un solo pool positivo con valori  $>$  a 250 UPG (612 UPG), cioè ritenuti sempre da Ambrosi (1995) per la dicroceliosi ovina indicatori di situazione a rischio zootecnico. Per *F. hepatica* i valori medi sono risultati pari a 66 ( $\pm 78,6$ ) UPG, con il 33,3% dei pools esaminati con valori superiori a 80 UPG, indicativi anche in questo caso di rischio zootecnico.

### **Riscontri al mattatoio**

Il monitoraggio svolto in ovini allevati nel nord Sardegna e regolarmente macellati ha consentito di rilevare nel 24,71% e nell’1,96% dei soggetti controllati infestioni rispettivamente da *D. dendriticum* (88/356) e da paramfistomidi nel rumine e reticolo (7/356), mentre non veniva rilevata alcuna infestione da *F. hepatica*.

In particolare, per ciò che concerne l’entità delle infestioni riscontrate, abbiamo rilevato che nei fegati degli ovini parassitati erano presenti nel 60,22% (53/88) un numero inferiore a 50 esemplari di *D. dendriticum*, mentre nei restanti 39,78% di organi (35/88) il numero dei parassiti presenti era  $\geq$  a 50. Non sempre negli organi parassitati, specie se presenti un numero limitato di parassiti, era possibile rilevare lesioni macroscopicamente apprezzabili, che se presenti, erano date perlopiù da una superficializzazione dei dotti biliari più evidente nella parte superiore destra superficie viscerale del fegato e da un modico ispessimento dei piccoli dotti biliari evidenziabile nella superficie di taglio (foto n°20).

## **5.2. QUESTIONARIO SUL CONTROLLO DELLA DICROCELIOSI OVINA**

Prima sezione – I veterinari intervistati seguivano in media 65 aziende ciascuno (range da 20 a 150), che corrispondevano ad una media di 15.913 ovini (range da 2.000 a 35.000), mentre la consistenza media delle greggi era di 293,9 (Dev.St. 111,3). Secondo i veterinari la prevalenza media dell’infestione da *D. dendriticum*

nelle loro greggi era la seguente: < al 5% per il 5,1% (n°2); < al 10% per il 10,2% (n°4); 10% per il 28,2% (n°11); 20% per il 15,4% (n°6); 30% per il 17,9% (n°7); 40% per il 5,1% (n°2); 50% per 10,2% (n°4); 70% per il 2,6% (n°1); 90% per il 5,1% (n°2).

In base alle interviste gli allevatori considerano la dicroceliosi: scarsamente importante nel 17,9% dei casi (n°7); di media importanza nel 20,5% dei casi (n°8); di molta importanza nel 61,5% dei casi (n°24).

Seconda sezione – La diagnosi della dicroceliosi veniva eseguita attraverso delle analisi coprologiche volte alla ricerca delle uova del trematode dal 74,4% dei veterinari; queste analisi venivano svolte: nell’8,3% dei casi presso laboratori diagnostici privati (n°2); nel 12,5% dei casi (n°3) direttamente nei loro ambulatori; nel 20,8% dei casi presso il laboratorio di Parassitologia del Dipartimento di Medicina Veterinaria dell’Università di Sassari (n°5); nel 50% dei casi (n°12) presso i laboratori dell’IZS della Sardegna; nell’8,3% dei casi (n°2) infine i veterinari si rivolgevano indifferentemente al laboratorio di Parassitologia del Dipartimento di Medicina Veterinaria dell’Università di Sassari o ai laboratori dell’IZS della Sardegna. Solo un Veterinario intervistato è stato in grado di riportare il livello di UPG riscontrato nei confronti della parassitosi, che era intorno a 50.

Il 66,7% dei veterinari (n°26) ricorrono per la diagnosi anche all’esame anatomopatologico che svolgono direttamente nel 19,2% dei casi (n°5), il 34,6% (n°9) ricorre ai laboratori dell’IZS, il 7,7% (n°2) ai laboratori del Dipartimento di Medicina Veterinaria dell’Università, il 7,7% (n°2) ricorre indifferentemente ai laboratori dell’IZS o del Dipartimento di Medicina Veterinaria e sempre il 7,7% (n°2) ai laboratori dell’IZS o ad esami anatomopatologici svolti direttamente in prima persona. Nel 33,3% dei casi la diagnosi viene effettuata esclusivamente in base ai sintomi che per i veterinari risultavano essere quelli riportati nella tabella n°4.

Terza sezione – Il trattamento antiparassitario viene attuato dai Veterinari in base ai seguenti parametri (dato rilevato su 58 risposte fornite in quanto ogni veterinario esprimeva talvolta più parametri): trattamento strategico 32,8% (n°19); diagnosi coprologica 25,9% (n°15); sintomatologia clinica evidente 17,2% (n°10); stagionalità 24,1% (n°14). Per trattamenti strategici si intendono quelli attuati in particolari

circostanze, come per esempio prima del cambio di un pascolo, prima delle vaccinazioni, in ogni caso sempre prima della comparsa di manifestazioni cliniche.

I trattamenti venivano attuati con i seguenti principi attivi (dato rilevato su 49 risposte fornite): il 36,7% (n°18) utilizzano il netobimin; 34,7% (n°17) albendazolo micronizzato all'1,9%; 22,4% (n°11) albendazolo micronizzato al 10%; 2% (n°1) albendazolo sulfossido; 2% (n°1) mebendazolo; 2% (n°1) closantel/clorsulon.

Per ciò che concerne invece la modalità di trattamento sono state riferite le seguenti dato rilevato su 39 risposte fornite): il 15,4% (n°6) propongono un singolo trattamento attuato con la dose “standard” indicata nel foglio illustrativo per i nematodi e cestodi gastro-intestinali; sempre il 15,4% (n°6) attua invece un singolo trattamento con il dosaggio “doppio” indicato generalmente come efficace nel foglio illustrativo dei farmaci per i distomi epatici; il 38,5% (n°15) utilizza un duplice trattamento con la dose “standard”; il 30,8% (n°12) effettua un doppio trattamento con il dosaggio “doppio”. Nel caso dei duplici trattamenti il periodo tra un intervallo e l'altro appare alquanto variabile, in quanto questi venivano attuati nel totale dei 27 casi riportati secondo i seguenti intervalli: tra i 7 e 10 giorni 22,2% (n°6); tra gli 11 e 15 giorni 18,5% (n°5); tra i 16 e 20 giorni 18,5% (n°5); tra i 21 e 30 giorni il 25,9% (n°7); oltre i 30 giorni il 7,4% (n°2); il 7,4% dei Veterinari (n°2) non ricordava il periodo di intervallo suggerito tra un trattamento e l'altro. Da rilevare che tra i 25 casi in totale in cui è stato utilizzato l'albendazolo micronizzato, per il quale la casa produttrice indica per la terapia della dicroceliosi l'attuazione di un doppio trattamento a distanza di 7 giorni uno dall'altro, tale intervallo è stato rispettato nel 20% dei casi (n°5); solo in un caso in cui sono state utilizzate altre molecole il trattamento è stato ripetuto entro l'intervallo di 7-10 giorni.

I veterinari nel 61,5% dei casi (24/39) dichiarano di effettuare una verifica dell'efficacia del trattamento.

### **5.3. TRIALS DI CAMPO OVINI**

#### **Trial di campo per verificare l'efficacia dell'albendazolo nei confronti della dicroceliosi in gregge con sospetto di farmacoresistenza**

Nella tabella n°5 sono stati riportati i valori di UPG e relativa efficacia nei diversi gruppi monitorati nel corso della prima prova.

Nella tabella n°6 vengono riportate le elaborazioni effettuate tramite il test di Mann-Whitney per confrontare le differenze tra le medie di UPG tra i tre gruppi nei vari giorni di prelievo.

Nella tabella n°7 sono stati riportati i valori di UPG e relativa efficacia nei diversi gruppi del secondo trial.

Nella tabella n°8 vengono riportate le elaborazioni effettuate tramite il test di Mann-Whitney per confrontare le differenze tra le medie di UPG tra i tre gruppi del secondo trial nei vari giorni di prelievo.

Nessuna reazione avversa si è registrata negli animali trattati nei due trials in seguito alla somministrazione del farmaco.

### **Trial di campo per la valutazione dei protocolli terapeutici con albendazolo nei confronti della dicroceliosi ovina**

I risultati ottenuti applicando il protocollo P1 negli allevamenti A, B, C, D ed E, (somministrazione 14 giorni prima del trattamento con albendazolo-Valbazen 1,9%<sup>®</sup>-di moxidectina alla dose di 0,2 mg/Kg p.v. - Cydectin<sup>®</sup> 0,1% - Zoetis Italia - allo scopo di eliminare i nematodi gastro-intestinali eventualmente presenti che avrebbero potuto interferire con l'efficacia del trattamento successivo nei confronti della dicroceliosi con l'albendazolo alla dose di 10,45 mg/kg p.v.-Valbazen 1,9%<sup>®</sup> - Zoetis Italia ripetuto dopo una settimana, sono riportati nella tabella n°9, in cui sono indicati i valori di UPG rilevati nei vari momenti del monitoraggio, insieme ai valori di efficacia rilevata a G 7 e G 14. I risultati ottenuti applicando il protocollo P2 negli allevamenti D e G (somministrazione di albendazolo alla dose di 10,45 mg/kg p.v., pari a 11 ml della sospensione ogni 20 kg p.v., ripetuto dopo una settimana) sono riportati nella tabella n°10. I risultati ottenuti applicando il protocollo P3 nell'allevamento D, E ed F, cioè la somministrazione di albendazolo alla dose di 10 mg/kg p.v., pari a 1 ml della sospensione ogni 10 kg p.v. (Valbazen 10%), ripetuto dopo una settimana, sono riportati nella tabella n°11. I risultati ottenuti applicando il protocollo P4 nell'allevamento D ed F con l'utilizzo di un dosaggio doppio rispetto alle modalità indicate nel foglietto illustrativo del prodotto usato (Valbazen 10%<sup>®</sup>), cioè la somministrazione di albendazolo alla dose di 20 mg/kg p.v., pari a 2 ml della sospensione ogni 10 kg p.v. in un'unica somministrazione), sono riportati nella

tabella n°12. Nessuna reazione avversa si è registrata negli animali trattati nei trials attuati in seguito alla somministrazione dei farmaci nei diversi allevamenti.

### **Trial di campo per verificare l'efficacia dell'ossiclozanide nei confronti della paramfistomosi ovina**

I risultati della prova che prevedeva la somministrazione dell'associazione ossiclozanide + levamisolo in due dosaggi differenti, il primo corrispondente alle indicazioni fornite dal produttore del farmaco usato (Toloxan<sup>®</sup>) pari a 0,5 ml/kg p.v. (15 mg/kg p.v.) e il secondo pari a 1,5 la dose consigliata, cioè 0,75 ml/kg p.v. (22,5 mg/kg p.v.).

L'analisi statistica delle medie di UPG nei 3 differenti gruppi di trattamento (Gruppo Verde: controllo non trattato; GRUPPO BLU: trattato con Toloxan<sup>®</sup> al dosaggio di 0,75 ml di sospensione/ kg P.V. in un'unica somministrazione; GRUPPO ROSSO: trattato con Toloxan<sup>®</sup> al dosaggio di 0,5 ml di sospensione/ kg p.v. in un'unica somministrazione), effettuata tramite il test non parametrico di Mann-Whitney, non ha rilevato differenze statisticamente significative tra i tre gruppi monitorati a G 0.

Nella tabella n°13 sono stati riportati i valori di UPG e relativa efficacia dei trattamenti riscontrata nei diversi gruppi di ovini monitorati.

Nella tabella n°14 vengono riportate le elaborazioni effettuate tramite il test di Mann-Whitney per confrontare le differenze tra le medie di UPG tra i tre gruppi nei vari giorni di prelievo.

## 5.4. RILIEVI EPIDEMIOLOGICI BOVINI

### Riscontri copromicroscopici

Uova di paramfistomidi, di *D. dendriticum* e di *F. hepatica* sono state rilevate rispettivamente nel 55,93% (33/59), nel 20,33% (12/59) e nell'8,47% (5/59) degli allevamenti monitorati; questi tassi di prevalenza per le diverse parassitosi differivano significativamente tra loro ( $\chi^2$  con due gradi di libertà= 35,51;  $P < 0,0001$ ).

### Riscontri al mattatoio

Esemplari adulti di *D. dendriticum*, *F. hepatica* e di paramfistomidi sono stati reperiti rispettivamente nell'8,96% (119/1.328), nello 0,68% (9/1.328) e nel 10,89% (55/505) dei soggetti controllati.

Le cariche parassitarie riscontrate per *D. dendriticum* erano nel 46,26% (31/67)  $\geq$  a 100 trematodi in localizzazione, le restanti 53,74% (36/67) erano caratterizzate da un numero superiore di trematodi che solo in due casi (13,4%) superavano i 1000 esemplari; tuttavia macroscopicamente non si rilevavano generalmente lesioni evidenti sicuramente riportabili all'azione di questo trematode.

Nei fegati positivi a *F. hepatica* le cariche parassitarie riscontrate non hanno mai superato i venti esemplari maturi all'interno dei dotti biliari, che si presentavano ispessiti con reazioni fibrose (foto n°21) e in alcuni casi con calcificazioni a carico della parte interna; tali lesioni sono state riscontrate anche in altri 5 fegati, sequestrati all'atto della visita post-macellazione, ma nei quali non si riscontravano esemplari di trematodi.

Nel rumine e reticolo dei soggetti infestati da paramfistomidi adulti si riscontravano invece le seguenti cariche parassitarie:

- $\leq$  di 50 esemplari nel 34,61% dei casi (18/52);
- $> 50$  e  $\leq$  a 100 esemplari nel 30,76% dei casi (16/52);
- $>$  di 100 esemplari nel 15,38% dei casi (8/52).

Le uniche lesioni macroscopicamente evidenti erano costituite da formazioni definite “a poppatoio” che si evidenziavano dopo il distacco del parassita dalla parete dell’organo determinate dalla ventosa acetabulare dello stesso (foto n°22).

## **5.5. TRIALS DI CAMPO BOVINI**

### **Trial di campo nei confronti della paramfistomosi bovina**

Per quanto riguarda i risultati ottenuti con il trial inerente la valutazione dell’efficacia dell’associazione ossiclozanide+levamisolo nella terapia della paramfistomosi bovina, nella tabella n°15 sono riportate le medie di UPG e le relative Deviazioni Standard dei due gruppi di trattamento nei diversi giorni di monitoraggio.

I risultati ottenuti con il test di Mann-Whitney per confrontare le differenze delle medie di UPG ai vari prelievi nell’ambito dello stesso gruppo di trattamento sono riportati nella tabella n°16. Nel gruppo di bovini trattati con albendazolo (Gruppo A), sono state riscontrate delle differenze statisticamente significative soltanto tra le medie del G 0 e quelle del G 14, mentre nessuna differenza è stata registrata negli altri giorni del monitoraggio ( $P > 0.05$ ); al contrario nel gruppo di bovini trattati con l’associazione ossiclozanide-levamisolo (Gruppo O) sono state rilevate differenze statisticamente significative tra il G 0 e tutti gli altri giorni del monitoraggio ( $P > 0.05$ ).

Un confronto statistico delle medie di UPG effettuato tra i due gruppi di trattamento nelle varie fasi di prelievo non ha evidenziato alcuna differenza significativa tra le medie di UPG dei due gruppi a G 0, mentre ha rilevato una media inferiore delle UPG del Gruppo O, statisticamente significativa rispetto a quella del Gruppo A nei prelievi a G 21, G 45 e G 75 (tabella n°17).

Le percentuali di efficacia secondo le linee guida della WAAVP (Wood et al., 1995), dei due trattamenti nei vari prelievi sono riportate nella tabella n°18 per giudicare efficace un farmaco risulta necessario raggiungere valori di FECR superiori al 90% e dalla tabella n°18 si evince come questa percentuale non sia mai stata rilevata in nessun controllo post-trattamento in entrambi i farmaci utilizzati. Fra i due farmaci le performances migliori sono state registrate nel Gruppo O trattato con l’associazione ossiclozanide/levamisolo, con percentuali di efficacia pari all’80,5% nel G 21 e all’82% nel G 45, per poi diminuire successivamente al 54,5% nel G 75.



### **Trial di campo nei confronti della dicroceliosi bovina**

I livelli medi di UPG per uova di *D. dendriticum* rilevati durante il trial di campo negli animali in sperimentazione erano: 8 UPG a G 0; 3,3 UPG a G 14; 0,2 UPG a G 21; 2,2 UPG a G 45; 10,5 UPG a G 75. Il Test di Mann-Whitney attuato per confrontare le medie di UPG tra G 0 e G 14, G 21 e G 45 del monitoraggio ha rilevato differenze altamente significative ( $P < 0,01$ ).

Il livello di efficacia dell'albendazolo è risultato il seguente: 60,9% a G 14; 97,8% a G 21; 79% a G 45; nessun livello di efficacia si era invece riscontrato a G 75, momento in cui i valori di UPG erano superiori a quelli di G 0. La massima copronegativizzazione di soggetti trattati si è registrata a G 21 con l'83,3% di animali negativi alle uova di *D. dendriticum*.

### **5.6. PROVA TASSONOMICA BIOMOLECOLARE PARAMFISTOMIDI**

L'analisi della sequenza ITS-2+ di ciascun campione esaminato proveniente da paramfistomidi isolati nel presente campionamento o dalla collezione storica del settore di Parassitologia ha mostrato una lunghezza uniforme di 428 bp, composta da tutto il frammento ITS-2 (282 bp), più quelle del 5.8S (99 bp) e del 28S (47 bp).

Inoltre, nessuna variazione intra-specifica è stata osservata nella composizione nucleotidica del ITS-2 + (omologia = 100%) fra i 18 isolati sequenziati. Il confronto delle sequenze con quelle presenti in GenBank, effettuato tramite il software Blast, ha mostrato invece un'omologia pari al 100% (415/415 Identità) con la sequenza omologa (ITS-2 +) di *Calicophoron daubneyi* (GB: AY790883.1) isolata nel sud Italia da Rinaldi et al. nel 2005. Per poter valutare meglio la filogenesi degli isolati repertati in Sardegna, le sequenze ottenute sono state messe a confronto con quelle omologhe (ITS-2 +) di diverse specie di paramfistomidi, ed in particolare con *Calicophoron microbothrium* (GB: GU735639.1; GU735640.1; GU735644.1; GU735647.1; GU735649.1; GU735650.1; GU735651.1; GU735652.1; GU735653.1; GU735654.1; GU735655.1; GU735656.1), *Cotylophoron cotylophorum* (GB: KC503917.1), *Paramphistomum leydeni* (GB: HM209065.1; HM209064.1; HM209066.1; HM209067.1), *Paramphistomum cervi* (GB: HM026462.1) e *Paramphistomum epiclitum* (GB: JF834888).

Gli isolati sardi, così come la sequenza presente in Genbank di *C. daubneyi*, presentavano un'omologia del 98% con *Calicophoron calicophorum* (406/416 identità) e del 97% con *C. microbothrioides* (405/416 Identità).

Le sequenze degli isolate Sardi mostravano una distanza (pairwise distance) pari a 0.022 con *Calicophoron microbothrium*, di 0.045 con *Cotylophoron cotylophorum* e di 0.052 con *Paramphistomum epiclitum*. La visualizzazione delle varie specie in forma grafica è apprezzabile dall'albero filogenetico in cui sono state inserite tutte le specie e le sequenze di cui sopra e calcolate mediante il metodo "Maximum Likelihood" di Tamura et al. (1993).

Nell'albero filogenetico (figura n°1) si vede chiaramente come gli isolati Sardi clusterizzino assieme a *C. daubneyi* e si separino dalle altre specie di *Calicophoron*, *Cotylophoron* e *Paramphistomum*.

I rilievi morfologici condotti allo stereomicroscopio in parallelo agli esami tassonomici biomolecolari hanno evidenziato come *C. daubneyi* abbia delle caratteristiche anatomiche differenti relativamente alla ventosa acetabulare cpon *P. leydeni*. In particolare infatti l'acetabulo di *C. daubneyi* è privo di una protrusione periferica labiale (foto n°23) che invece si riscontra in *P. leydeni* (foto n°24).

Tale particolare anatomico risulta l'unico apprezzabile in modo oggettivo, in quanto striature trasversali del corpo parassitario e forma più tozza di *C. daubneyi* rispetto a *P. leydeni* potrebbero essere particolari morfologici variabili o legati alla fissazione/conservazione degli esemplari esaminati o alla specie ospite.

## 6. DISCUSSIONE

Le indagini copromicroscopiche condotte nell'ambito degli allevamenti ovini monitorati hanno evidenziato una evidente diffusione delle trematodosi, anche se distribuite in modo non uniforme, causate soprattutto da *D. dendriticum* e da paramfistomidi, riscontrate rispettivamente nel 22,04% e 13,91% delle aziende controllate. La presenza della dicroceliosi in Sardegna tuttavia, per quanto assolutamente non sottovalutabile, risulta inferiore rispetto ad altre regioni italiane in cui è praticata l'ovinicoltura, quali ad esempio l'Umbria (80% aziende positive) (Venditti et al. 2010), le regioni appenniniche meridionali (67,5%) (Cringoli et al. 2002), la Campania 67% (Musella et al., 2011) e la Basilicata (62%) (Cringoli et al., 2012). Tuttavia nell'isola la dicroceliosi, in considerazione anche delle acquisizioni ottenute tramite il questionario sottoposto ai veterinari aziendali, viene ritenuta una patologia importante dagli allevatori, considerazione condivisibile soprattutto se riferite a determinate aree dell'isola ritenute storicamente a forte rischio per questa infestione, come certe aree dell'oristanese, della Nurra, ecc. In proposito è utile sottolineare che purtroppo il dato acquisito stratificato per le province storiche della Sardegna non consente di identificare situazioni particolari nell'ambito di territori ristretti, tanto è vero che questo dato non identifica aree dell'isola particolarmente a rischio di infestione, probabilmente invece identificabili tramite l'applicazione di protocolli che prevedono l'uso del GIS con la suddivisione del territorio in aree più numerose e quindi di estensione più contenuta. La dicroceliosi ovina in Sardegna veniva segnalata su indagini condotte al mattatoio su circa il 50% dei capi controllati a partire dal triennio 1960-1961 e sino al 1990 (Tanda e Arru, 1963; Scala et al., 1991), con prevalenze del 10% riscontrate a fine degli anni '90 in ovini macellati in provincia di Cagliari (Scala et al., 2000), mentre coprologicamente veniva riscontrata nel triennio 1985-1987 in percentuali variabili dal 38 al 12,5% (Sanna et al., 1989), contro il 6,7% di quelli riscontrati positivi in un'indagine condotta nel 2001 (Sanchez-Andrade et al., 2003). Le nostre indagini evidenziano invece questa parassitosi nel 24,71% degli ovini macellati.

La sensazione che ne scaturisce quindi, è che la diffusione della dicroceliosi in Sardegna sia nettamente calata rispetto al periodo degli anni '60 sino agli anni '90 e che negli ultimi anni si sia stabilizzata o sia solo leggermente in aumento.

In ogni caso in base ai risultati anche delle analisi delle medie delle UPG riscontrate nelle diverse greggi positive a *D. dendriticum* e al numero di esemplari adulti riscontrati a livello epatico, sembrerebbe emergere a carico della dicroceliosi ovina in Sardegna una situazione non molto grave per quanto concerne le cariche parassitarie presenti, anche se le medie di UPG rilevate nei pools fecali esaminati indicano nell'8,7% dei casi situazioni di rischio zootecnico che eventualmente possono necessitare di un controllo profilattico-terapeutico attento.

Nel caso invece della distomatosi da *F. hepatica* l'esame dei dati bibliografici disponibili evidenzerebbe come questa distomatosi negli anni abbia subito un'importante diminuzione della pressione parassitaria sul territorio. Tale infestione infatti si rilevava nel triennio 1960-1961 nel 16% degli ovini regolarmente macellati (Tanda e Arru, 1963) e in percentuali variabili dal 28,5% al 16,5% nel triennio 1985-1987 in soggetti controllati copromicroscopicamente (Sanna et al., 1989). Appare evidente quindi, in base al mancato attuale nostro riscontro di fasciolosi nei capi macellati e alla contenuta % di aziende positive (2,36%), che la pressione parassitaria da parte di questo parassita nel settore ovino isolano sia notevolmente ridotta tanto da sembrare relegata probabilmente a zone ristrette, come nell'episodio di fasciolosi acuta da noi segnalato recentemente, in provincia di Nuoro dove l'infestione risultava da sempre presente (Bandino et al., 2011). Tuttavia anche questo recentissimo episodio sembrava rimarcare il fatto che la fasciolosi ovina in Sardegna non è ultimamente presente in modo rilevante, in quanto gli ovini colpiti risultavano non soggetti di rimonta, ma soggetti di diversi anni, segno evidente che la parassitosi in questo caso colpiva soggetti adulti che ancora non avevano acquisito un'immunità efficace data da precedenti contatti con il trematode.

I livelli medi di UPG riscontrati nei pools di feci ovine esaminati, indicano che nel 33,3% delle volte ci si trova di fronte a casi in cui il rischio zootecnico suggerisce degli interventi terapeutici, i quali a nostro avviso dovrebbero essere praticati in ogni caso negli ovini anche in presenza di livelli medi di UPG estremamente contenuti per limitare ancora di più la pressione del parassita sul nostro territorio.

La situazione sopra riportata relativa all'attuale scarsa presenza della fasciolosi, in base ai risultati da noi ottenuti, pensiamo sia direttamente legata anche alla diffusione in aumento della paramfistomosi ovina, parassitosi in precedenza solo segnalata

nell'isola da Deiana et al. nel 1962, ma mai quantizzata in precisi termini epidemiologici; tuttavia questa parassitosi nel tempo pare sia stata “dimenticata” o ritenuta “scomparsa” nell'ovino; una dettagliata indagine copromicroscopica condotta da Sanna et al. (1989), relativa al triennio 1985-1987 su 18.350 campioni di feci ovine, non ha mai fatto riferimento al riscontro di uova di paramfistomidi, nonostante riportasse invece importanti tassi di prevalenza per altri trematodi, come *F. hepatica* e *D. dendriticum*. L'attuale nostro riscontro quindi del 13,9% delle aziende positive con una prevalenza dell'1,96% degli ovini controllati al mattatoio sembrerebbe quindi indicare la paramfistomosi ovina come una malattia emergente nell'isola; questo evento epidemiologico viene infatti confermato anche da Ambrosi (1995) in altre aree del Lazio e della Lombardia. L'acquisizione dei dati tassonomici biomolecolari, che indicano il paramfistomide presente come *Calicophoron daubneyi*, deporrebbe per una “sostituzione” sul territorio delle infestioni da *F. hepatica* con quelle di *C. daubneyi*, parassitosi che “utilizza” lo stesso ospite intermedio, cioè il mollusco *G. truncatula*, sembrerebbero confermare tale evenienza. Appare quindi verosimile che i numerosi trattamenti antielmintici attuati nel tempo nei confronti di *F. hepatica* con molecole altamente efficaci nei suoi confronti, possano aver lasciato campo libero ai miracidi di *C. daubneyi* di competere con successo per la “conquista” di *G. truncatula*, anche perché quest'ultimo trematode appare nettamente sottostimato e sottovalutato in campo ovino, e su di esso non risulta venga attuato alcun trattamento farmacologico mirato (Scala et al., 1999). In effetti, considerate le cariche parassitarie riscontrate, solo in un caso al momento attuale sarebbe stato consigliabile attuare un intervento antielmintico. Tuttavia le caratteristiche “emergenti” riscontrate nei confronti della paramfistomosi ovina, a nostro avviso devono imporre in ogni caso una continua sorveglianza epidemiologica nei suoi confronti.

Un aspetto particolarmente delicato riguarda l'approccio profilattico-terapeutico da riservare a queste parassitosi. Infatti se si fa eccezione per la fasciolosi, parassitosi per la quale esistono protocolli terapeutici ampiamente conosciuti e di provata efficacia, soprattutto per la forma adulta (Urquhart et al., 1998), lo stesso discorso non può risultare attualmente valido per la dicroceliosi e per la paramfistomosi. Per queste ultime distomatosi infatti sul territorio vengono messe in atto misure di

controllo e terapeutiche alquanto differenti e spesso prive di supporti diagnostici adeguati.

I questionari esaminati sui trattamenti relativi alla dicroceliosi ovina, seppur numericamente non elevati, evidenziano in ogni caso, in base ai risultati della prima sezione (es. numero di allevamenti e di capi ovini seguiti), come i Veterinari che hanno collaborato a questa indagine siano professionisti che si dedichino in modo importante a questo settore zootecnico e che quindi le informazioni acquisite possano essere uno specchio fedele di quanto attualmente si attua nella maggior parte del territorio isolano nei confronti della terapia della dicroceliosi ovina. Le risposte inerenti la diffusione di questa distomatosi epatica in effetti confermano, a grandi linee, quanto rilevato da noi coprologicamente e al mattatoio i dati sulla sua diffusione. Si presume che questo dato possa essere stato acquisito dai veterinari in seguito al numero di positività riscontrate alle analisi copromicroscopiche e/o anatomopatologiche effettuate. Tuttavia questa situazione, seppure di pressione parassitaria apparentemente definibile non proprio grave, porta oltre il 60% degli allevatori a definire la dicroceliosi come una parassitosi molto importante.

Riguardo le modalità di diagnosi attuate quella copromicroscopica è risultata più praticata, anche se “meraviglia” il fatto che un veterinario su 4 non ne faccia ricorso. La maggior parte dei professionisti fa riferimento a laboratori “istituzionali” (IZS) o dell’Università, mentre è risultato decisamente contenuto il ricorso ad analisi svolte direttamente dal veterinario (12,5%), che a nostro avviso potrebbe essere incrementato, soprattutto per abbreviare i tempi di diagnosi. Decisamente di difficile interpretazione è il dato relativo alle cariche parassitarie presenti misurate attraverso delle analisi copromicroscopiche quantitative (valutazione delle UPG): solo un professionista riporta il livello di UPG presente negli ovini degli allevamenti seguiti. E’ indubbio quindi che si renda maggiormente necessario richiedere con maggior “convinzione” un esame coprologico quantitativo ai laboratori, per acquisire un dato essenziale per una corretta valutazione nella pianificazione o meno di un intervento antielmintico; in tal senso quindi preoccupa questa carenza di informazione tra i veterinari. Abbastanza buono il ricorso all’esame anatomo-patologico (66,7% dei casi), anche se forse, considerando soprattutto il limite dell’analisi coprologica nel caso di infestioni causate negli ovini da un numero non elevato di elminti ( $\leq$  a 100)

(Ambrosi, 1995), sarebbe opportuno incrementare anche questo tipo di indagine. Soprattutto a riguardo preoccupa la totale assenza di informazioni acquisite al mattatoio, che per questa parassitosi dovrebbe confermare il suo ruolo di osservatorio epidemiologico privilegiato in quanto a costo zero, assolutamente affidabile e attuabile in tempo reale. Purtroppo però in Sardegna la presenza di altre infestioni, quali l'echinococcosi cistica, che comporta l'esclusione "automatica" del fegato dell'ovino adulto dal commercio, rende impossibile l'acquisizione di tale dato (il fegato viene direttamente avviato alla distruzione senza talvolta essere esaminato in modo appropriato per il riscontro di questa parassitosi dal veterinario ispettore). Così come quindi già auspicato da Scala (2006), si renderebbe opportuno intraprendere delle relazioni "più forti" tra veterinario ispettore e veterinario aziendale per l'acquisizione di questi dati utili per la pianificazione di interventi antiparassitari razionali.

La diagnosi effettuata esclusivamente su basi sintomatiche appare, in considerazione della pressione parassitaria risultata presente sul territorio (Scala, 1991; Scala, 2000), e dei dati acquisiti nella presente indagine, forse un po' azzardata, soprattutto in assenza di ulteriori riscontri diagnostici. Inoltre il riportare quale sintomo principale l'edema sottomandibolare ci lascia, anche in base alla nostra esperienza, quantomeno un po' perplessi sul riconoscimento su basi esclusivamente sintomatiche della parassitosi! In questo senso potrebbero essere interpretati a nostro avviso anche i sintomi tipo ittero e subittero riportati dai veterinari intervistati.

Per ciò che riguarda invece la scelta del principio attivo effettivamente al momento attuale ci troviamo di fronte a delle scelte per certi versi "obbligate", non essendo molte le molecole efficaci a disposizione sul mercato italiano. Si è passati infatti dall'uso negli anni '60/'70 del tiabendazolo che alla dose di 110 mg/kg pv aveva per Arru et al. (1967) un'"azione evidente", diminuendo notevolmente gli esemplari del trematode a livello epatico, mentre aveva un effetto "quasi completo" al dosaggio di 210 mg/kg pv, eliminando in questo caso i parassiti da quasi tutti gli ovini trattati. Successivamente l'arma efficace nei confronti era data dal tiofanato, probenzimidazolico che già alla dose di 50 mg/kg pv era risolutivo (Ambrosi, 1995), ma attualmente non è più disponibile in commercio. La terapia nei confronti di questa parassitosi viene per cui ristretta all'uso dell'albendazolo o del netobimin,

probenzimidazolico che viene trasformato in albendazolo e che secondo Veneziano et al. (2006) risulterebbe efficace al 96,4%, o del closantel, che sembrerebbe attivo nei confronti di *D. dendriticum* già alla dose normale di 5mg/kg pv (Ambrosi 1995). Non è invece proponibile l'uso di altre molecole quali il mebendazolo, febendazolo, febantel e praziquantel che agirebbero nei confronti del trematode esclusivamente a dosi elevatissime non praticabili.

Secondo i dati scaturiti dall'elaborazione del questionario, in Sardegna i trattamenti antielmintici per la dicroceliosi risultano attuati soprattutto "strategicamente" (32,8%) e solo in ¼ circa dei casi (25,7%) in base ai rilievi copromicroscopici, forse anche a causa delle difficoltà inerenti il riscontro delle uova vista la loro "pesantezza", che risponde in modo differente alle varie metodiche utilizzate (Cringoli et al., 2004) e alle dinamiche legate alla scarsa o nulla eliminazione di uova in infestioni date da meno di 100 elminti in localizzazione.

Piuttosto appaiono estremamente variegati i protocolli attuati che prevedono l'uso di tali molecole nei confronti della dicroceliosi a dosi nettamente più elevate rispetto a quelle standard che agiscono nei confronti dei nematodi gastro-intestinali e che, come nel caso dell'albendazolo micronizzato prevede un ulteriore trattamento a distanza di 7 giorni dal primo per ottimizzare il grado di efficacia (Bosco et al., 2012). In effetti l'albendazolo micronizzato raggiunge a 30 giorni dal trattamento un'efficacia pari al 96,5%, mentre nel caso della ripetizione dello stesso a 7 giorni si raggiunge un'efficacia, sempre a 30 giorni del 99% (Bosco et al., 2012). In molti casi si opta per un trattamento a dosi corrette, ma non si procede al secondo trattamento, o se lo si fa solo nel 22,2% dei casi avviene entro i termini appropriati indicati dal produttore del farmaco utilizzato (7 giorni). E' evidente che i protocolli terapeutici attuati in molti casi non risultino ottimali sotto il profilo dell'efficacia e quindi delle produzioni, nonché pericolosi sotto l'aspetto epidemiologico, in quanto allevatore e veterinario si convincono di avere a che fare dopo i trattamenti con delle greggi "pulite" per il *D. dendriticum*, ma che a livello pratico continuano invece a eliminare nell'ambiente un ampio numero di uova, rendendo quindi i pascoli più pericolosi.

Per ciò che concerne invece il trial attuato per verificare l'efficacia terapeutica di una specialità farmaceutica a base di ossiclozanide+levamisolo, la sola attualmente disponibile in commercio in Italia per la terapia della paramfistomosi nei ruminanti,



possiamo affermare che i risultati hanno evidenziato una maggior efficacia del dosaggio pari ad una volta e mezzo (0,75 ml/kg p.v.) rispetto alla dose consigliata dalla casa produttrice del farmaco stesso (0,5 ml/kg p.v.). Da rilevare inoltre che i livelli di efficacia riscontrati per il gruppo di soggetti trattati con la dose consigliata, pari a 0,5 ml/kg p.v., non ha mai raggiunto il 90% in nessuno dei momenti del monitoraggio, vale a dire dunque, che tali livelli, secondo le linee guida della WAAVP (Wood et al., 1995), indicherebbero una possibile farmacoresistenza. Considerando invece i livelli di efficacia, addirittura superiori al 99% al primo controllo post-trattamento rilevati nel nostro trial nel gruppo trattato con il dosaggio pari ad una volta e mezzo quello consigliato (0,75 ml/kg p.v.), possiamo affermare che non si possa trattare di farmacoresistenza, bensì di un sottodosaggio del farmaco, che alle dosi consigliate nell'ovino non è in grado di garantire livelli di efficacia accettabili. Tuttavia anche se le medie di UPG riscontrate nel gruppo trattato con il dosaggio inferiore sono superiori a quelle del gruppo trattato con il dosaggio maggiore, tali differenze non sono risultate mai differenti dal punto di vista statistico in nessuno dei momenti di controllo post-trattamento ( $P > 0,05$ ). Viene quindi confermato il fatto, peraltro già in precedenza riportato da Georgies e Gruev (1977), che indicavano che livelli massimi di efficacia nei confronti della paramfistomosi ovina (85,1% - 89,1%) venivano raggiunti con una dose pari a 20 mg/kg p.v.

Anche questo aspetto non appare di secondaria importanza per l'attuazione di un intervento terapeutico nei confronti di questa trematodosi nell'ovino, in quanto la convinzione da parte di allevatore e veterinario di aver attuato un trattamento farmacologico corretto ed efficace non è supportato in realtà da una condizione ottimale, in quanto è vero che si riducono sensibilmente le cariche parassitarie presenti, ma non si raggiunge un livello di efficacia auspicabile che garantirebbe anche una ripresa più ritardata dell'ovodeposizione con gli effetti positivi auspicati sulla diminuzione della contaminazione ambientale da parte delle forme di propagazione del parassita. Appare quindi ovvio che in tali condizioni si possano favorire eventuali fenomeni di farmacoresistenza in virtù del possibile aumento della frequenza di trattamenti attuati a causa della scarsa funzionalità degli stessi qualora effettuati alla dose consigliata dalla casa produttrice e per il fatto stesso che a tali

dosaggi il farmaco stesso risulti in pratica sottodosato e quindi ancora di più possibile artefice di fenomeni di farmacoresistenza oggi sempre più temuti ed attuali.

Proprio questi fenomeni di farmacoresistenza purtroppo sembrerebbero esser presenti in Sardegna nei confronti dell'albendazolo da parte di *D. dendriticum*. Il trial condotto su un gregge in provincia di Sassari in cui i trattamenti precedenti attuati dal veterinario aziendale non avevano sortito gli effetti sperati, confermano che nell'isola potrebbero essere presenti tali fenomeni o che, come nel caso del trattamento della paramfistomosi ovina prima descritto, il farmaco per ottenere livelli di efficacia > del 90% debba essere somministrato a dosaggi più elevati rispetto a quelli indicati nel foglietto illustrativo del prodotto testato. In effetti i risultati ottenuti nel trial condotto, non hanno mai rilevato livelli di efficacia accettabili con nessuno dei protocolli utilizzati, neanche con quello che prevedeva il raddoppio del dosaggio pari cioè a 20 mg/kg p.v., sia con il prodotto alla concentrazione del principio attivo all'1,9% come a quello al 10%. Infatti purtroppo il livello più elevato di efficacia si è registrato al G 14 post trattamento con un valore pari al 69,7% nel gruppo trattato con il farmaco con il principio attivo concentrato al 10%. Tra i due gruppi trattati in entrambi i trials effettuati non si sono mai riscontrate differenze significative delle medie di UPG dei gruppi nei differenti giorni del monitoraggio, ad eccezione proprio del G 14 post trattamento in cui si rilevava il livello più elevato di efficacia del principio attivo al 10% (69,7% vs 58,8%). Appare quindi evidente che in questo gregge sembrerebbe proprio che fenomeni di farmacoresistenza nei confronti di *D. dendriticum* possano essere presenti. Si tratterebbe quindi di una prima segnalazione di fenomeni di antielminticoresistenza evidenziati in Sardegna nell'ovino.

Tale riscontro tuttavia nel caso specifico non dovrebbe sembrare strano, in quanto in effetti si sono venute a creare per la dicroceliosi tutta una serie di eventi che potrebbero averlo determinato. L'uso dell'albendazolo estremamente utilizzato nell'isola per la lotta nei confronti delle strongilosi gastro-intestinali al dosaggio di 3,8 mg/kg p.v., è risultato sottodosato nelle greggi in cui tale trattamento veniva effettuato alla cieca in assenza di adeguate analisi copromicroscopiche in grado di rilevare la presenza contemporanea anche di *D. dendriticum*. In effetti i trattamenti, come rilevato anche nei risultati del questionario compilato dai veterinari, vengono

attuati in assenza di adeguate diagnosi copromicroscopiche in molti casi, e che anche quando attuate, queste vengono richieste per valutare la presenza di uova di strongili gastro-intestinali, cioè vengono richieste analisi che non prevedono l'attuazione di tecniche atte a rilevare la presenza anche delle uova di *D. dendriticum*. Peraltro è ormai ampiamente risaputo che le uova di questo trematode sono difficilmente rilevabili nei casi di infestioni determinate da un numero di esemplari maturi in localizzazione < ai 100. E' evidente quindi, anche in base alle cariche parassitarie da noi rilevate al mattatoio, che nella maggior parte dei casi in Sardegna vengano trattate delle greggi per gli strongili gastro-intestinali senza sapere, anche nel caso vengano attuate indagini diagnostiche adeguate a rilevare la presenza di uova di *D. dendriticum*, che si agisce su animali positivi a questo trematode, attuando anche involontariamente condotte terapeutiche che favoriscono l'insorgenza di fenomeni di antelminticoresistenza nei suoi confronti.

Alla luce di quanto sopra riferito appaiono interessanti i risultati ottenuti con lo step di questa indagine inerente i trial di campo attuati per valutare i diversi protocolli terapeutici attuati sul territorio con l'albendazolo nei confronti della dicroceliosi con dosaggi, periodi di somministrazione e prodotti a diversa concentrazione del principio attivo (1,9% e 10%).

In particolare si è evidenziato come l'unico protocollo in grado di ottenere livelli di efficacia del trattamento > al 90% è risultato quello P4, cioè quello che prevedeva l'uso di un dosaggio doppio rispetto alle modalità indicate nel foglietto illustrativo del prodotto usato (Valbazen 10%®), cioè la somministrazione di albendazolo micronizzato alla dose di 20 mg/kg p.v., pari a 2 ml della sospensione ogni 10 kg p.v. in un'unica somministrazione. Infatti nei due allevamenti in cui è stato applicato questo protocollo al G 14 si riscontravano le % di efficacia più elevate pari a 98,9% e 96,5%, livelli di efficacia che si mantenevano sempre superiori o prossimi al 90% (All. F – 89,9%) sino al G 28. Da tenere in considerazione tuttavia che l'uso dell'albendazolo a tale dosaggio non è consigliabile nelle pecore all'inizio della gravidanza a causa dei possibili problemi teratogeni determinati (Ambrosi, 1995).

Nell'ambito degli altri protocolli utilizzati una % di efficacia > al 90% è stata riscontrata esclusivamente a G 21 nell'All. F, in cui si riscontrava un livello di efficacia pari al 91,1% con il protocollo P3, cioè con la somministrazione di

albendazolo alla dose di 10 mg/kg p.v., pari a 1 ml della sospensione ogni 10 kg p.v. (Valbazen 10%<sup>®</sup>), ripetuto dopo una settimana.

Appare quindi chiaro nei nostri casi che l'uso dell'albendazolo alle dosi consigliate dal produttore del farmaco non sono risultati efficaci per il trattamento della dicroceliosi ovina. Inoltre i livelli di efficacia estremamente contenuti ottenuti con il protocollo P1 nell'All. A, pari a 8,35% al G 7 e 2,8% al G 14, e con il protocollo P2 e P3 nell'All. G, in cui non si sono riscontrati livelli di efficacia con il P2 e solo del 9,7% al G 14 con il P3, sembrerebbero purtroppo confermare quanto rilevato con i trials di campo nel gregge con "sospetto di farmacoresistenza", cioè che in Sardegna vi possano essere dei fenomeni di farmacoresistenza all'albendazolo da parte di *D. dendriticum*.

I risultati delle indagini copromicroscopiche dei 59 allevamenti bovini monitorati attuate su pools di feci hanno confermato anche in questa specie nell'isola la presenza di entrambe le due distomatosi epatiche e di quella gastrointestinale, con una significativa maggior diffusione della dicroceliosi rispetto alle altre due distomatosi. Tuttavia, come era facile aspettarsi, rispetto alle indagini precedenti condotte sempre in Sardegna nell'arco del triennio 1960-1962 (Tanda e Arru, 1963), la diffusione di tali distomatosi si è radicalmente modificata. Soprattutto i dati rilevati al mattatoio evidenziano come ci sia stato un netto declino della fasciolosi anche nel settore bovino; si è passati infatti da una prevalenza del 31% riferibile al triennio 1960-1962 allo 0,68% riscontrato nella presente indagine, mentre sostanzialmente non sembra essere cambiata la situazione inerente la dicroceliosi, rilevata nel triennio sopra menzionato nel 10% dei capi macellati e nei nostri casi nell'8,96% dei casi.

E' evidente quindi come per la fasciolosi, sia per quanto concerne l'ambito bovino come quello ovino, la situazione sia nettamente migliorata, tanto da poter definire, in base ai dati acquisiti con la presente indagine, una parassitosi apparentemente destinata ad un notevole ridimensionamento della sua pressione parassitaria nel territorio. Le mutate situazioni legate al management aziendale e alle misure di profilassi ambientale hanno determinato una diminuzione notevole delle aree a rischio fascioligene attraverso il risanamento dei pascoli e l'uso più mirato di farmaci

efficaci nei suoi confronti che si ritiene possano essere responsabili di questo fenomeno anche nel settore ovino.

Per ciò che concerne i risultati dei trials terapeutici attuati nel bovino si è evidenziato che nelle infestioni da paramfistomidi di nessuna utilità terapeutica si è rilevato con il protocollo da noi utilizzato l'albendazolo, contrariamente a quanto riportato da Urquhart et al. (1998), mentre, seppure con livelli che non hanno mai raggiunto il 90%, l'associazione ossiclozanide/levamisolo sembrerebbe allo stato attuale in Italia l'unico farmaco disponibile in commercio in grado di garantire alle dosi indicate per altri trematodi una certa efficacia per almeno 45 giorni dalla sua somministrazione, pur avendo determinato una percentuale di copronegativizzazione dei soggetti trattati solo nel 15,4% a G 14.

In analogia a quanto da noi riscontrato in quest'indagine nella terapia della paramfistomosi ovina, l'aumento del dosaggio dell'associazione ossiclozanide+levamisolo potrebbe trovare probabilmente un'utile applicazione anche in campo bovino, per migliorare le percentuali di efficacia del trattamento stesso. I nostri risultati a riguardo sembrerebbero quindi non confermare neanche quanto riportato nelle indicazioni terapeutiche relative ad un preparato farmacologico registrato in India per la paramfistomosi a base di ossiclozanide (Flokxy della Leo Bio-care PVT. LTD.), che suggerisce l'uso di una dose pari a 10-15 mg/kg p.v..

E' evidente quindi, in base ai dati epidemiologici acquisiti, che attualmente la paramfistomosi in Sardegna possa essere considerata una parassitosi "emergente" e quindi, un problema sanitario di un certo interesse nei confronti della quale dovrebbero essere validati ufficialmente i protocolli terapeutici da noi valutati.

Infine possiamo affermare, soprattutto nel bovino, che il riscontro di *D. dendriticum* a livello epatico, considerando la scarsa entità dell'azione patogena attuata, in questa specie animale costituisce quindi ancora un non sottovalutabile mancato introito economico a causa del sequestro dell'organo all'atto della visita post-macellazione. Di conseguenza potrebbe essere utile l'attuazione, negli allevamenti positivi a questo trematode, di un trattamento antiparassitario a base di albendazolo da attuare secondo il protocollo da noi utilizzato, che al contrario di quello riscontrato nell'ovino, in questa specie animale sembrerebbe sortire alle dosi consigliate una buona efficacia. Tale trattamento potrebbe essere attuato al limite del periodo di sospensione per

l'utilizzo delle carni indicato dalla casa farmaceutica dell'antelmintico utilizzato, cioè 25 giorni prima della macellazione, quando si ottiene un'efficacia del 97,8% e una copronegativizzazione di oltre l'80% degli animali trattati.

La presente indagine ha consentito di caratterizzare geneticamente anche in Sardegna, *Calicophoron daubneyi* confermando quanto recentemente riscontrato in altri distretti da Rinaldi et al. (2005) e Paraud et al. (2009). Bisogna però ricordare che la classificazione effettuata su basi morfometriche, quale quella attuata prima dell'avvento della biologia molecolare, nell'ambito dei paramfistomidi presenta non poche difficoltà, per cui non possiamo escludere che le specie indicate nelle indagini tassonomiche condotte prima degli anni '90 debbano, o possano essere, prese in considerazione con molta prudenza.

Le tecniche diagnostiche tradizionali in parassitologia sono ora integrate da una serie di strumenti biomolecolari che aiutano a risolvere i problemi tassonomici associati a descrivere nuove specie, ceppi e varianti genetiche sulla base delle caratteristiche fenotipiche e/o epidemiologiche, così come di osservazioni in particolari aree endemiche (Thompson, 2004).

Nel presente lavoro abbiamo utilizzato dei marker del DNA ribosomiale come la regione ITS2+ per poter differenziare dei parassiti che dal punto di vista macro e microscopico sono molto difficili da identificare. Questa problematica ha fatto sì ad esempio che queste parassitosi venissero comunemente chiamate dagli addetti ai lavori (veterinari, allevatori e ricercatori stessi) come paramfistomosi da *Paramphistomum cervi*, la specie "ritenuta" propria dell'area mediterranea o segnalata dalla maggior parte dei testi classici. Uno dei risultati di questo lavoro è stato quello di dimostrare, sebbene su un *sample size* non grandissimo, che i parassiti isolati in Sardegna appartengono tutti ad un'altra specie ed un altro genere, ovvero *C. daubneyi*.

L'altro aspetto interessante di questo studio risulta quello "storico", dato che è stato possibile lavorare sul DNA di parassiti isolati dai ricercatori del Settore di Parassitologia dell'Università di Sassari negli anni 70 ed 80, classificati come "*Paramphistomum*" e che sono risultati morfologicamente e geneticamente identici a *C. daubneyi*.

In ogni caso la presenza nel territorio nazionale della specie *C. daubneyi*, comporta parallelamente anche una revisione di alcune caratteristiche epidemiologiche della parassitosi, in quanto, come già riferito, usufruendo tale specie dello stesso mollusco ospite intermedio di *F. hepatica*, cioè *G. truncatula*, le due distomatosi tendono a sovrapporsi nello stesso areale. Infatti la calicoforonosi, grazie a questo ospite, può quindi diffondersi non solo in habitat permanenti, più facilmente colonizzati soprattutto da popolazioni di molluschi dei generi *Planorbis* e *Bulinus*, ma anche in habitat temporanei in cui la *G. truncatula* può facilmente svilupparsi.

Tuttavia appare ancora più probabile che la maggiore diffusione della calicoforonosi rispetto alla fasciolosi possa essere messa in relazione con il grado di efficacia delle molecole antielmintiche nei loro confronti, in quanto queste risultano molto efficaci per *F. hepatica* e molto meno per la calicoforonosi come già riferito in precedenza. Inoltre bisogna anche prendere in considerazione il fatto che la fasciolosi da *F. hepatica* viene ampiamente controllata sotto l'aspetto diagnostico a livello di visita post-macellazione, mentre purtroppo, come già riferito, viene solitamente meno il controllo degli organi interni quali il ruminale ed il reticolo, sedi dei calicoforidi.

Per questo motivo la diffusione di questi parassiti tende ad essere spesso sottostimata e quindi anche sottovalutata dal punto di vista epidemiologico, garantendo così alla calicoforonosi una maggiore diffusione sul territorio.

L'indagine ha anche consentito di confermare che i bovini e gli ovini sono infestati dagli stessi parassiti e che non esiste una variabilità a seconda dell'ospite, così come peraltro rilevato in Campania e sud Italia da Rinaldi et al. (2005).

## 7. CONCLUSIONI

Concludendo possiamo quindi affermare che le trematodosi dei ruminanti monitorate costituiscono ancora oggi in Sardegna un problema sanitario-zootecnico ed ispettivo non sottovalutabile, anche se lo stesso ha subito delle modifiche importanti rispetto al passato per alcuni parametri epidemiologici.

In particolare si è evidenziato come la fasciolosi, parassitosi particolarmente importante, abbia subito un'evidente diminuzione della sua pressione parassitaria sia nell'ovino quanto nel bovino, a testimonianza di una maggiore riuscita delle operazioni profilattico terapeutiche attuate nel tempo nell'isola.

Stesso discorso purtroppo non si è potuto rilevare per la dicroceliosi, che continua ad essere riscontrata con alti assi di prevalenza sia negli ovini che nei bovini.

I risultati in campo ovino confermano i limiti terapeutici dei trattamenti ottenuti nei suoi confronti purtroppo anche probabilmente per gli errori relativi ai dosaggi che hanno determinato la comparsa di fenomeni di farmacoresistenza nei confronti dell'albendazolo, molecola maggiormente utilizzata nella terapia della dicroceliosi nell'isola.

Tale situazione non deve essere sottovalutata, ma resa nota agli addetti ai lavori, i quali dovrebbero attuare protocolli mirati nei confronti di questa parassitosi, quali quelli che prevedono un'unica somministrazione dell'albendazolo a dose doppia rispetto a quanto indicato nel foglio illustrativo (20 mg/kg pv), da attuare in soggetti non all'inizio della gravidanza.

A riguardo, anche i risultati del questionario evidenziano quanto sia necessario un aggiornamento delle linee guida sulla terapia di questa parassitosi in modo da fornire al veterinario delle informazioni precise ed efficaci.

Lo scarso ricorso ad indagini diagnostiche mirate, comporta una condotta profilattico-terapeutica talvolta inadeguata, che può portare alla comparsa di fenomeni di farmacoresistenza e all'uso scorretto del farmaco, con tutti i problemi connessi relativi ai residui dei farmaci, alle perdite per il non utilizzo del latte, alle perdite economiche relative all'acquisto e alla somministrazione dei farmaci stessi. Purtroppo un altro problema importante nell'ambito della "gestione" del trattamento della dicroceliosi è dato dallo scarso ricorso al controllo dell'efficacia del trattamento



attuato, che alla luce dei dati acquisiti sull'efficacia degli stessi andrebbe invece assolutamente praticato.

Più confortante invece il risultato dell'approccio terapeutico nel bovino nei confronti della dicroceliosi, infatti se effettuato in modo corretto garantisce dei livelli di efficacia maggiori del 90%, cioè tali da essere considerati ottimali.

Le cariche parassitarie generalmente limitate riscontrate in entrambe le specie di ruminanti monitorate non sembrano evidenziare realmente un rilevante ruolo patogeno esercitato da questa parassitosi, tuttavia nel bovino la perdita determinata all'atto della visita post-macellazione è ancora da considerarsi importante in Sardegna. Al contrario dell'ovino, nel bovino la condotta ispettiva attuata secondo le normative ispettive vigenti (Regolamento CE 854/2004) non consente di rilevare sempre tali infestazioni per cui si renderebbe opportuno applicare ulteriori misure di controllo, quali ad esempio dei tagli aggiuntivi rispetto a quelli previsti a livello epatico. Infatti le analisi coprologiche attuate nei bovini macellati hanno evidenziato uova di *D. dendriticum* in soggetti in cui la visita post-macellazione, attuata con i tagli indicati nella normativa vigente sul fegato, non ha consentito il riscontro del parassita e quindi il licenziamento a libero consumo del viscere parassitato.

Per ciò che concerne invece la paramfistomosi possiamo concludere che la stessa rappresenta un'infestazione spesso sottovalutata, basti pensare al fatto che in Sardegna non è stata menzionata fino al 1987 (Sanna et al., 1989), nonostante i risultati ottenuti tramite il presente studio dimostrino la sua presenza nel 13,9% degli allevamenti.

Purtroppo perlomeno in Italia non sono reperibili in commercio dei farmaci di prima scelta nei confronti di questa parassitosi, mentre quelli dotati di una certa efficacia non risultano registrati per la terapia di questa infestazione. A riguardo i protocolli terapeutici da noi effettuati con molecole a cui era attribuita una certa funzionalità nei confronti dei paramfistomidi hanno rilevato la mancata funzionalità dell'albendazolo nel controllo della paramfistomosi bovina, mentre i trials terapeutici attuati con l'ossiclozanide nell'ovino hanno evidenziato livelli di elevata efficacia del 99,3% già al G 7 dalla somministrazione, al dosaggio però di 22,5 mg/kg p.v, cioè pari ad 1,5 volte quello indicato per le fasciolosi, mentre al dosaggio di 15 mg/kg p.v nel bovino l'efficacia più elevata pari all'80,7% si riscontra a G 45.

Va quindi evidenziato che in regioni quali la Sardegna debba probabilmente essere riconsiderata la condotta del veterinario ispettore al mattatoio nei confronti del rilievo soprattutto della dicroceliosi e paramfistomosi.

Nel caso della prima infatti dovrebbero essere attuati dei tagli ispettivi aggiuntivi al fegato dei bovini per evitare il licenziamento al libero consumo di organi parassitati e una revisione/implementazione delle operazioni di controllo dei prestomaci dei ruminanti per il riscontro della paramfistomosi, parassitosi attualmente non ricercata dal veterinario ispettore.

Appare ovvio quindi che in assenza di tali riscontri il mattatoio potrebbe perdere quel ruolo importante di osservatorio epidemiologico privilegiato estremamente importante per la gestione e il controllo razionale delle parassitosi in un determinato territorio.

Importante infine l'acquisizione del dato tassonomico relativo alla specie di paramfistomidi presenti nei ruminanti della Sardegna identificati come *C. daubneyi*, cioè di un trematode che utilizza quale ospite intermedio il mollusco gasteropode anfibio *G. truncatula*, cioè lo stesso di *F. hepatica*.

## 8. BIBLIOGRAFIA

Abo-Madyan, A.A., Morsy, T.A., Motawea, S.M., Morsy, A.T., 2004. Clinical trial of Mirazid in treatment of human fascioliasis, Ezbet El-Bakly (Tamyia Center) Al Fayoum Governorate. *J. Egypt Soc. Parasitol.* 34, 807–818.

Adams H.R., 1999. *Farmacologia e terapeutica veterinaria*. Ed. EMSI, Roma.

Adlard R.D., Barker S.C., Blair D., Cribb T.H., 1993. Comparison of the second internal transcribed spacer (ribosomal DNA) from populations and species of Fasciolidae (Digenea). *Int. J. Parasitol.*, 23:423–425.

Agatsuma T., Arakawa Y., Iwagami M., Honzako Y., Cahyaningsih U., Kang S.Y., Hong S.J., 2000. Molecular evidence of natural hybridization between *Fasciola hepatica* and *F. gigantica*. *Parasitol. Int.*, 49, 231–238.

Alunda, J.M., Rojo-Vázquez, F.A., 1983. Survival and infectivity of *Dicrocoelium dendriticum* eggs under field conditions in NW Spain. *Vet. Parasitol.* 13, 245–249.

Alvarez, L.I., Mottier, M.L., Sanchez, S.F., Lanusse, C.E., 2001. Ex vivo diffusion of albendazole and its sulfoxide metabolite into *Ascaris suum* and *Fasciola hepatica*. *Parasitol. Res.* 87, 929–934.

Alvarez, L.I., Mottier, M.L., Lanusse, C., 2004. Comparative assessment of the access of albendazole, fenbendazole and triclabendazole to *Fasciola hepatica*: effect of bile in the incubation medium. *Parasitology* 128, 73–81.

Alvarez-Sanchez, M.A., Mainar-Jaime, R.C., Perez-Garcia, J., Monteagudo-Rodriguez, M., Martin-Gomez, S., Rojo-Vazquez, F.A., 2001. Some problems related to the use of albendazole in sheep flocks for the control of mixed natural infection by gastrointestinal and liver fluke parasites. 18th International Conference of the WAAVP, Stresa (Italia), 26–30.

Alvarez-Sanchez, M.A., Mainar-Jaime, R.C., Perez-Garcia, J., Rojo-Vazquez, F.A., 2006. Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole and albendazole in sheep in Spain. *Vet. Rec.* 159, 424–425.

Ambrosi, M., 1991. La diagnostica coprologica nelle elmintiasi di allevamento: caso delle distomatosi dei ruminanti. *Praxis Vet.* 12, 17–21.

Ambrosi M., 1995. Parassitologia Zootecnica. Edagricole, Bologna.

Ambrosi M., Baldelli B., Piergili Fioretti D., Polidori G.A., Girelloni V., Moretti A., Principato M., 1980. Dicroceliosi ovina: insorgenza e decorso dell'infezione da *Dicrocoelium dendriticum* studiati con metodi parassitologici e sierologici (ELISA) in quattro gruppi di ovini di traccia. Rivista di Parassitologia, 3, 299–307.

Anil M.H., Forbes J.M., 1980. Feeding in sheep during intraportal infusions of short-chain fatty acids and the effect of liver denervation. J. Physiol. 298, 407–414.

Armour J., Urquart G.M., Jennings F.W., Reid J.F.S., 1970. Studies on ovine fasciolosis. Vet. Rec. 86, 274–277.

Arru E., Deiana S., 1969. Gli ospiti intermedi di *Paramphistomum* (*P. cervi*) in Sardegna. Atti S.I.S.Vet., 23, 909-911.

Arru E., Deiana S., Casu S., 1967. Azione del tibenzone nella strongilosi gastro-intestinale e nella dicroceliasi degli ovini. Veterinaria italiana, 18, 536-562.

Arru E., Deiana S., Muzzetto P., 1970. Paramphistomosi intestinale dei ruminanti. Infestione sperimentale degli ovini con metacercarie ed esemplari immaturi di *Paramphistomum cervi* Rivista di Parassitologia, 31(1), 33-42.

Asanji M.F., Williams M.O., 1984. The effect of sex on seasonal variation on single and double infection of cattle in Sierra Leone by *Dicrocoelium hospes* and *Fasciola gigantica*. Vet. Parasitol. 15, 247–255.

Baer J.G., Joyeux C., 1961. Classe des trématodes (Trematoda Rudolphi). Traité de Zoologie, Anatomie, Systématique, Biologie. Tome IV, Premier Fascicule. Plathelminthes, Mésozoaires, Acanthocéphales, Némertiens. Grassé P.P. (Editor), Paris: Masson et Cie, 61-677.

Baldelli B., Piergili Fioretti D., Ambrosi M., Polidori G.A., Girelloni V., Moretti A., 1981. Dicroceliosi ovina: studio degli anticorpi verso *Dicrocoelium dendriticum* in agnelli nati da pecore spontaneamente infette. Rivista di Parassitologia, 1, 23–30.

Bandino E., Mulas M., Bassu G., Masia G., Maricosu G., Sanna G., Goddi L., 2011. Acute fasciolosis in sheep flock in Sardinia. XII Congreso Ibérico de Parasitología: July 5-8, Zaragoza, Spain.

Barber K.E., Mkoji G.M., Loker E.S., 2000. PCR-RFLP analysis of the ITS2 region to identify *Schistosoma haematobium* and *S. bovis* from Kenya. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 62, 434–440.

Barnett C., Hossell J., Perry M., Procter C., Hughes G., 2006. A handbook of climate trends across Scotland. SNIFFER project CC03. Scotland and Northern Ireland Forum for Environmental Research, 62 [www.sniffer.org.uk/climatehandbook/index.html](http://www.sniffer.org.uk/climatehandbook/index.html).

Bártíková H., Vokřál I., Forstová-Křížová V., Skálová L., Lamka J., Szotáková B., 2011. the transport of albendazole and albendazole sulfoxide in the lancet fluke (*Dicrocoelium dendriticum*). *Veterinary Parasitology*, 176, 27-33.

Bath G.F., van Wyk J.A., 2009. The Five Point Check© for targeted selective treatment of internal parasites in small ruminants. *Small Ruminant Research*, 86 (1-3), 6-13.

Beckham S.A., Piedrafita D., Phillips C.I., Samarawickrema N., Law R.H.P., Smooker P.M., Quinsey N.S., Irving J.A., Greenwood D., Verhelst S.H.L., Bogyo M., Turk B., Coetzer T.H., Wijeyewickrema L.C., Spithill T.W., Pike R.N., 2009. A major cathepsin B protease from the liver fluke *Fasciola hepatica* has atypical active site features and a potential role in the digestive tract of newly excysted juvenile parasites. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41 (7), 1601–1612.

Behm C.A., Sangster N.C., 1999. Pathology, pathophysiology and clinical aspects. In: Dalton J.P. (Ed.), *Fasciolosis*. CAB Publishing, Oxon, UK, 185–224.

Bennema S.C., Ducheyne E., Vercruyse J., Claerebout E., Hendrickx G., Charlier J., 2010. Relative importance of management, meteorological and environmental factors in the spatial distribution of *Fasciola hepatica* in dairy cattle in a temperate climate zone. *Int. J. Parasitol.* 41, 225–233.

Boch J. e Supperer R., 1980. *Parassitologia Clinica Veterinaria*, Ed. Essegivi Piacenza.

Boray J.C., 1959. Studies on intestinal paramphistomosis in cattle. *Australian Veterinary Journal*, 35, 282-287.

Boray J.C., 1969. Experimental fascioliasis in Australia. *Adv. Parasitol.* 7, 95–210.

Boray J.C., 1971. The pathogenesis of ovine intestinal paramphistomatosis due to *P. ichikawai*, in Gaafar, Pathology of parasitic diseases, Pardue University Studies, Lafayette, 209.

Boray J.C., 1982. Fasciolosis. Hillyer J.G., Hopla C.E. (Eds.), CBC Handbook Series in Zoonoses, vol. III. CBC Press, Florida, 77–88.

Boray J.C., 1985. Flukes of domestic animals. Gafaar, S.M., Howard, W.E., Marsh R.E. (Eds.), Parasites, Pests and Predators. Elsevier, Amsterdam, 179-218.

Boray J.C., 1986. Trematode infections of domestic animals. Boray J.C., Martin P.J., Roush R.T. (Eds.), Chemotherapy of Parasitic Diseases. Plenum Press, New York, 401–425.

Boray J.C., 1990. Drug resistance in *Fasciola hepatica*. Boray J.C., Martin P.J., Roush R.T. (Eds.), Round Table Conference of the VIIth ICOPA on Resistance of Parasites to Antiparasitic Drugs. Paris, 51–57.

Boray J.C., 1997. Chemotherapy of infections with Fasciolidae. Boray J.C. (Ed.), Immunology, Pathobiology and Control of Fasciolosis. MSD AGVET, Rahway, NJ, 83–97.

Boray J., Crowfoot P., Strong M., Allison J., Schellenbaum M., von Orelli M., Sarasin G., 1983. Treatment of immature and mature *Fasciola hepatica* infections in sheep with triclabendazole. Vet. Rec. 113, 315–317.

Boray J.C., de Bono D., 1989. Drug resistance in *Fasciola hepatica*. In: Outteridge, P.M., Richards, R.B. (Eds.), Advances in Veterinary Science. The Australian Veterinary Association, Artarmon, Australia, 166.

Bosco A., Rinaldi L., Salamina V., Santaniello M., Morgoglione M. E., Guariglia I., Cappelli G., Cringoli G., 2012. Prova controllata di campo sull'efficacia dell'albendazolo micronizzato verso *Dicrocoelium dendriticum* in ovini naturalmente parassitati, Congresso SIPAOC, 26-29 settembre.

Boyd J.W., 1962. The comparative activity of some enzymes in sheep, cattle and rats – normal serum and tissue levels and changes during experimental liver necrosis. Res. Vet. Sci. 3, 419–433.

Bruce R.G., Armour J., Corba J., 1973. A further study of epidemiology of ovine fascioliasis in Scotland and its control using mollusquicide. Vet. Rec. 92, 51–52.

Bulman G.M., Caracostantogolo J., Lamberti J.C., Zenon A.A., Balbiani G., 2002. *Cotylophoron cotylophorum* (Fischöeder, 1901) (Digenea, Paramphistomidae), trematode of bovine rumen, in Argentina. *Vet. Argent.* 19, 673–682.

Cabaret J., Galkin-Cabaret T., 1985. Milieu et repartition des mollusques hôte intermédiaire protostrongles en touraine. *Rec. Méd. Vét.* 161, 117–125.

Calamel M., 1977. Application de la technique d'immunofluorescence indirecte à l'étude épidémiologique de la dicrocoeliose. *Rec. Méd. Vét.* 153, 343–348.

Camara L., Pfister K., Aeschlimann A., 1996. Analyse histopathologique de foie de bovin infesté par *Dicrocoelium dendriticum*. *Vet. Res.* 27, 87–92.

Campo R., Manga-González M.Y., González-Lanza C., 2000. Relationship between egg output and parasitic burden in lambs experimentally infected with different doses of *Dicrocoelium dendriticum* (Digenea). *Vet. Parasitol.* 87, 139–149.

Cancela M., Ruetalo N., Dell'Oca N., da Silva E., Smircich P., Rinaldi G., Roche L., Carmona C., Alvarez-Valin F., Zaha A., Tort J.F., 2010. Survey of transcripts expressed by the invasive juvenile stage of the liver fluke *Fasciola hepatica*. *BMC Genom.* 11, 227.

Caron Y., Righi S., Lempereur L., Saegerman C., Losson B., 2011. An optimized DNA extraction and multiplex PCR for the detection of *Fasciola* spp. in lymnaeid snails. *Vet. Parasitol.*, 178, 93–99.

Chartier C., Reche B., 1992. Gastrointestinal helminths and lungworms of french dairy goats: prevalence and geographical distribution in poitou-charentes. *Vet. Res. Commun.*, 16, 327–335.

Chauvin A., Bouvet G., Boulard C., 1995. Humoral and cellular Immune response to *Fasciola hepatica* experimental primary and secondary infection in sheep. *Int. J. Parasitol.* 25, 1227–1241.

Civinini, 1842, citato da Deiana et al., 1962. Paramfistomosi intestinale in capre della Sardegna. *Veterinaria Italiana*, XIII, 1029-1039.

Coles G.C., Bauer C., Borgsteede F.H.M., Geerts S., Klei T.R., Taylor M.A., Waller P.J., 1992- World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.P.)

method for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* 44, 35-44.

Colwell D.D., Goater C.P., 2010. *Dicrocoelium dendriticum* in cattle from Cypress Hills, Canada, Humoral response and preliminary evaluation of and ELISA. *Vet. Parasitol.* 164, 162–165.

Cörba J., Krupicer I., 1992. Efficacy of intraruminal albendazole boluses against *Dicrocoelium dendriticum* in sheep. *Parasitol. Res.*, 78, 640–642.

Cörba J., Krupicer I., Legény J., Juris P., Vesely L., 1991. Effect of a controlled-release albendazole capsule on parasitism and productivity of sheep. *Vet. Parasitol.*, 40, 273–279.

Cringoli G., 2012. Parassiti in Basilicata - Quadro parassitologico di base negli allevamenti bovini ed ovini. *Mappe parassitologiche*, 15, Napoli.

Cringoli G., Rinaldi L., Veneziano V., 2002. A cross-sectional coprological survey of liver flukes in cattle and sheep from an area of the Southern Italian Apennines. *Vet. Parasitol.*, 108, 137-143.

Cringoli G., Taddei R., Rinaldi L., Veneziano V., Musella V., Cascone C., Sibilio G., Malone J.B., 2004. Use of remote sensing and geographical information systems to identify environmental features that influence the distribution of paramphistomosis in sheep from the southern Italian Apennines. *Veterinary Parasitology*, 122, 15–26.

Cringoli G., Rinaldi L., Veneziano V., Capelli G., Scala A., 2004. The influence of flotation solution, sample dilution and the choice of McMaster slide area (volume) on the reliability of the McMaster technique in estimating the faecal egg counts of gastrointestinal strongyles and *Dicrocoelium dendriticum* in sheep. *Veterinary Parasitology*, 123, 121-131.

Dalton J.P., McGonigle S., Rolph T.P., Andrews S.J., 1996. Induction of protective immunity in cattle against infection with *Fasciola hepatica* by vaccination with cathepsin L proteinases and with hemoglobin. *Infect. Immun.*, 64, 5066–5074.

Daniel R., Mitchell S., 2002. Fasciolosis in cattle and sheep. *Vet. Rec.*, 151, 219.

Dargie J.D., 1987. Trematode infections in sheep and cattle: effects on productivity and metabolism. In: Leaning, W.H.D., Guerrero, J. (Eds.), *The Economic Impact of Parasitism in*



Cattle. Proceedings of the MSD AGVET Symposium. XXII World Veterinary Congress, Montreal, Quebec, Canada, 35–43.

Dargie J.D., Allonby E.W., 1975. Patophysiology of single and challenge infections of *Haemonchus contortus* in Merino sheep: study on the red cell kinetics and the “self-cure” phenomenon. *Int. J. Parasitol.*, 5, 147–157.

Dargie J.D., Berry C.I., Parkins J.J., 1979. The pathophysiology of ovine fascioliasis: studies on the feed intake and digestibility, body weight and nitrogen balance of sheep given rations of hay or hay plus a pelleted supplement. *Res. Vet. Sci.*, 26, 289–295.

Deiana S., 1953. *Bollettino della Società italiana di Biologia Sperimentale*, 29(12), 1939-1940.

Deiana S., Lei G.M., Arru E., 1962. Paramfistomosi intestinale in capre della Sardegna. *Veterinaria Italiana*, XIII, 1029-1039.

Deiana S., Arru E., 1963. Ulteriori indagini sulla paramfistomiasi in Sardegna. *La Ricerca Scientifica*, 33(II-b), 449-458.

Deiana S., Arru E., Nuvole A., 1966. L’infestazione di *Bulinus contortus* da cercarie di *Schistosoma bovis* e di *Paramphistomum cervi* in Sardegna. *Bollettino della Società Italiana di Biologia Sperimentale*, 42(14), 902.

Devine C., Brennan G.P., Lanusse C.E., Alvarez L.I., Trudgett A., Hoey E., Fairweather I., 2011. Enhancement of triclabendazole action in vivo against a triclabendazole-resistant isolate of *Fasciola hepatica* by cotreatment with ketoconazole. *Vet. Parasitol.* 177, 305–315.

Díaz P., Lomba C., Pedreira J., Arias M., Sánchez-Andrade R., Suárez J.L., Díez-Banos P., Morrondo P., Paz-Silva A., 2006. Analysis of the IgG antibody response against Paramphistomidae trematoda in naturally infected cattle. Application to serological surveys. *Veterinary Parasitology*, 140, 281–288.

Dinnik J.A. 1964. *Paramphistomum sukumum* sp. nov. and other stomach flukes from cattle in the Sukumaland area of the lake Region, Tanganyika. *Parasitology*, 54, 201-209.

Dorchies P., Bergeaud J.P., Durantou C., Prévot F., Tessier P., 1998. Extension de la paramphistomose bovine en France: résultats d’une enquête coproscopique sur 465 bovins dans treize départements. *Rev. Med. Vet.*, 149(11), 1029–1032.

Duchaček L., Lamka J., 2003. Dicrocoeliosis: the present state of knowledge with respect to wildlife species. *Acta Vet. Brno.*, 72, 613–626.

Eckert J., Hertzberg H., 1994. Parasite control in transhumant situations. *Vet. Parasitol.*, 54, 103–125.

Euzeby J., 1975- Les maladies vermineuses des animaux domestiques et leurs incidences sur la pathologie humaine. Tomo II, Maladies dues aux plathelminthes, troisième fascicule: trematodes, livre 2, Vigot Freres Editeurs, Paris., 28-29.

Fairweather I., 2005. Triclabendazole, New skills to unravel an old (ish) enigma. *J. Helminthol.*, 79, 227–234.

Fairweather I., 2009. Triclabendazole progress report, 2005–2009, an advancement of learning? *J. Helminthol.*, 83, 139–150.

Fairweather I., Boray J.C., 1999. Fasciolicides, efficacy, actions, resistance and its management. *Vet. J.*, 158, 81–112.

Fairweather, I., Threadgold, L.T., Hanna, R.E.B., 1999. Development of *Fasciola hepatica* in the mammalian host. In: Dalton, J.P. (Ed.), *Fasciolosis*. CAB International Publishing, Wallingford, Oxon, UK, pp. 47–111.

Farjallah S., Slimane B.B., Piras M.C., Amor N., Garippa G., Merella P., 2013. Molecular characterisation of *Fasciola hepatica* from Sardinia based on sequence analysis of genomic and mitochondrial gene markers. *Experimental Parasitology*, 135, 471-478.

Favennec L., Jave Ortiz J., Gargala G., Lopez Chegne N., Ayoub A., Rossignol J.F., 2003. Double-blind, randomized, placebo-controlled study of nitazoxanide in the treatment of fascioliasis in adults and children from northern Peru. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 17, 265–270.

Ferre I., Barrio J.P., Gonzalez-Gallego J., Rojo-Vazquez F.A., 1994. Appetite depression in sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica* L. *Vet. Parasitol.*, 55, 71–79.

Ferre I., Ortega-Mora L.M., Rojo-Vazquez F.A., 1995. Seroprevalence of *Fasciola hepatica* infection in sheep in Northwestern Spain. *Parasitol. Res.*, 81, 127–131.

Ferre I., Ortega-Mora L.M., Rojo-Vazquez F.A., 1997. Serum and bile antibody responses (IgG and IgA) during subclinical *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Vet. Parasitol.* 68, 261–267.

Fischoeder F., 1901. Die Paramphistomiden der Säugethiere. *Zoologischer Anzeiger*, 24, 367-375.

Fischoeder F., 1902. Die Paramphistomiden der Säugethiere. Inaugural- Dissertation Königsberg in Preussen, 59.

Fischoeder F., 1903. Die Paramphistomiden der Säugethiere. *Zoologische Jahrbücher, Abtheilung für Systematik, Geographic und Biologic der Thiere*, 17, 485-660.

Flanagan A.M., 2010. Development of diagnostic tests for the detection of resistance to triclabendazole in *Fasciola hepatica*. Ph.D. Thesis. The Queen's University of Belfast, Belfast.

Foster A.P., Otter A., O'Sullivan T., Cranwell M.P., Twomey D.F., Millar M.F., Taylor M.A., 2008. Rumen fluke (paramphistomosis) in Britain Cattle. *Vet. Rec.*, 162,528.

Fuhrmann O., 1928. Zweite Klasse des Cladus plathelminthes: Trematoda. *Handbuch der Zoologic*, Vol. 2, Berlin, Walten der Gruyter.

Fukui T., 1929. Studies on Japanese amphistomatous parasites, with revision of the group. *Japanese Journal of Zoology, Transactions and Abstracts*, 2, 219-351.

Gaasenbeek C.P.H., Over J.H., Noorman N., de Leeuw W.A., 1992. An epidemiological study of *Fasciola hepatica* in The Netherlands. *Vet. Q.*, 14, 140–144.

Gaasenbeek C.P.H., Moll L., Cornelissen J.B.W.J., Vellema P., Borsteede F.H.M., 2001. An experimental study on triclabendazole resistance of *Fasciola hepatica* in sheep. *Vet. Parasitol.*, 95, 37–43.

Galtier P., Larrieu G., Tufenkji A.E., Franc M., 1986. Incidence of experimental fascioliasis on the activity of drug-metabolizing enzymes in the lamb liver. *Drug Metab. Dispos.*, 14, 137–141.

García Pérez A.L., Juste Jordán R.A., Povedano Fernandez I., 1993. Diez anos de Parasitología en el SIMA, (1982–1992): relación de especies y hospedadores. Informe para el Índice–Catálogo de Zooparásitos ábericos.

Gasser R.B., Chilton N.B., 1995. Characterisation of taeniid cestode species by PCR-RFLP of ITS2 ribosomal DNA. *Acta Trop.*, 59, 31–40.

Genchi M., Traldi G., Genchi C., 2010. *Manuale di Parassitologia Veterinaria*, Casa Editrice Ambrosiana.

Georgiev B. e Gruev A., 1977. Effectiveness of oxcylozanide against paramphistomosis in cows and sheep. Abstract Vol. Third Nat. Conf. Parasit., Albena, Bulgaria, 238-239.

Gerlach J., Endicott J., Juranka P., Henderson G., Sarangi F., Deuchars K., Ling V., 1986. Homology between P-glycoprotein and a bacterial haemolysin transport protein suggest a model for multidrug resistance. *Nature*, 324, 485–489.

Giannetto S., Niutta P.P., Giudice E., 1994. Reperto di *Calicophoron microbothrium* in ovicapri della provincia di Messina. *Atti S.I.P.A.O.C.*, 11, 307.

Gill J.S., Bali H.S., 1988. Immunization of sheep with gamma-irradiated metacercariae of *Paramphistomum cervi*. *Zeder*, 1790, Fischroeder, 1901. *Cheiron*, 17, 79–82.

González-Lanza C., Manga-González M.Y., Del-Pozo-Carnero P., 1993. Coprological study of the *Dicrocoelium dendriticum* (Digenea) egg elimination by cattle in highland areas in León province. *Northwest Spain Parasitol. Res.*, 79, 488–491.

González-Lanza C., Manga-González M.Y., Campo R., Del-Pozo P., Sandoval H., Oleata A., Ramajo V., 2000. IgG antibody response to ES or somatic antigens of *Dicrocoelium dendriticum* (Trematoda) in experimentally infected sheep. *Parasitol. Res.*, 86, 472–479.

González-Warleta M., García-Presedo I., Castro-Hermida J.A., Miñambres B., González-Lanza C., Mezo M., Manga-González Y., 2008. Cattle slaughterhouse and field studies on the *Calicophoron daubneyi* (Dinnik 1962; Eduardo, 1983) infection (NW Spain). Xth European Multicolloquium of Parasitology, Paris, August, 24–29.

Gonzalo-Orden M., Millan L., Alvarez M., Sanchez-Campos S., Jimenez R., Gonzalez-Gallego J., Tunón M.J., 2003. Diagnostic imaging in sheep hepatic fascioliasis: ultrasound, computer tomography and magnetic resonance findings. *Parasitol. Res.* 90, 359–364.

Gunsseer I., Hanichen T., Maierl J., 1999. Leberegelbefall bei neuweltkameliden. Liver fluke in South American camelids. *Tierarztl. Prax.*, 27, 187–192.

Güralp N., Tinar R., 1983. Trematodiasis in Turkey: comparative efficacy of triclabendazole and niclofolan against natural infections of *Fasciola hepatica* and *F. gigantica* in sheep. *J. Helminthol.*, 58, 113–116.

Hafeez M.D., Rao B.V., 1986. Effect of single vaccination on the longevity of immunity produced by gamma irradiated amphistomemetacercariae (Cercariaeindicae, XXVI). *Indian Vet. J.*, 63, 106–108.

Hanna R.E., 1980. *Fasciola hepatica*, autoradiography of protein synthesis, transport, and secretion by the tegument. *Exp. Parasitol.* 50, 297–304.

Haridy F.M., El Garhy M.F., Morsy T.A., 2003. Efficacy of Mirazid (Commiphora molmol) against fascioliasis in Egyptian sheep. *J. Egypt. Soc. Parasitol.*, 33, 917–924.

Haroun E.M., Hillyer G.V., 1986. Resistance to fascioliasis: a review. *Vet. Parasitol.*, 20, 63–93.

Harris R.E., Charleston W.A., 1976. The epidemiology of *Fasciola hepatica* infections in sheep on a *Lymnaea columella* habitat in the Manawatu. *NZ Vet. J.*, 24 (1–2), 11–17.

Hawkins C.D., Morris R.S., 1978. Depression of productivity in sheep infected with *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol.* 4, 341–351.

Hennessy D., Lacey E., Steel J., Prichard R., 1987. The kinetics of triclabendazole disposition in sheep. *J. Vet. Pharmacol. Therapeut.*, 10, 64–72.

Himonas C.A., Liakos V., 1980. Efficacy of albendazole against *Dicrocoelium dendriticum* in sheep. *Vet. Rec.*, 107, 288–289.

Hinaidy H.K., 1983. *Dicrocoelium suppereri nomen novum* (syn. *D. orientalis* Sudarikov et Ryjikov 1951), ein neuer Trematode für die Parasitenfauna Österreichs. *Zentralbl. Veterinarmed.*, B 30, 576–589.

Holmes P.H., Dargie J.D., MacLean J.M., Mulligan W., 1968. The anaemia in fasciolosis studies with G-labelled red cells. *J. Comp. Pathol.*, 78, 415–420.

Hoove R.C., Lincoln S.D., Hall F.R., Wescott R., 1984. Seasonal transmission of *Fasciola hepatica* to cattle in northwestern United States. J. Am. Vet. Med. Assoc., 184, 695–698.

Horak I.G., 1962. Studies on Paramphistomiasis III: a method of testing the viability of paramphistome metacercariae. J. Vet. Res., 29, 197–202.

Horak I.G., 1967. Host-parasite relationships of *Paramphistomum microbothrium* Fiscoeder, 1901, in experimentally infested ruminants, with particular reference to sheep. Onderstepoort Journal of Veterinary Research, 34, 451-540.

Horak I.G., 1971. Paramphistomiasis of domestic animals. Adv. Parasitol., 9, 33-72.

Huang W.Y., He B., Wang C.R., Zhu X.Q., 2004. *Fasciola* species from Mainland China by ITS-2 ribosomal DNA sequence Vet. Parasitol., 120, 75-83.

Ichikawa M., Itagaki T., 2010. Discrimination of the ITS1 types of *Fasciola* spp. based on a PCR-RFLP method. Parasitol. Res., 106, 757–761.

Itagaki T., Sakaguchi K., Terasaki K., Sasaki O., Yoshihara S., Van Dung T., 2009. Occurrence of spermic diploid and aspermic triploid forms of *Fasciola* in Vietnam and their molecular characterization based on nuclear and mitochondrial DNA. Parasitol. Int., 58, 81–85.

Jackson F., Coop R.L., 2000. The development of anthelmintic resistance in sheep nematodes. Parasitology, 120, 95–107.

Jithendran K.P., Bhat T.K., 1996. Prevalence of dicrocoeliosis in sheep and goats in Himachal Pradesh. India. Vet. Parasitol., 61, 265–271.

Jithendran K.P., Bhat T.K., 1999. Epidemiology of parasitoses in dairy animals in the northwest humid himalayan region of India with particular reference to gastrointestinal nematodes. Trop. An. Health Prod., 31, 205–214.

Jithendran K.P., Vaid J., Krishna L., 1996. Comparative evaluation of agar gel precipitation, counterimmunoelectrophoresis and passive haemagglutination tests for the diagnosis of *Dicrocoelium dendriticum* infection in sheep and goats. Vet. Parasitol., 61, 151–156.

Kantzoura V., Kouam M.K., Feidas H., Teofanova D., Theodoropoulos G., 2011. Geographic distribution modelling for ruminant liver flukes (*Fasciola hepatica*) in south-eastern Europe. *Int. J. Parasitol.*, 41, 747–753.

Keck G. e Supperer R., 1967. Untersuchungen über den Großen Leberegel. 4. Die Gallengangsregeneration nach Abstoßen der Verkalkungen. *Wien. Tierärztl. Mschr.*, 54, 27–29.

Keiser J., Utzinger J., 2007. Food-borne trematodiasis, current chemotherapy and advances with artemisinins and synthetic trioxolanes. *Trends Parasitol.*, 23, 555–562.

Keiser J., Shu-Hua X., Jian X., Zhen-San C., Odermatt P., Tesana S., Tanner M., Utzinger J., 2006a. Effect of artesunate and artemether against *Clonorchis sinensis* and *Opisthorchis viverrini* in rodent models. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 28, 370–373.

Keiser J., Shu-Hua X., Tanner M., Utzinger J., 2006b. Artesunate and artemether are effective fasciolicides in the rat model and in vitro. *J. Antimicrob. Chemother.*, 57, 1139–1145.

Keiser J., Shu-Hua X., Chollet J., Tanner M., Utzinger J., 2007. Evaluation of the in vivo activity of tribendimidine against *Schistosoma mansoni*, *Fasciola hepatica*, *Clonorchis sinensis*, and *Opisthorchis viverrini*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 51, 1096–1098.

Kendall S.B., 1965. Relationships between the species of *Fasciola* and their molluscan hosts. *Adv. Parasitol.*, 3, 59–98.

Kenyon F., Sargison N.D., Skuce P.J., Jackson F., 2009. Sheep helminth parasitic disease in south eastern Scotland arising as a possible consequence of climate change. *Vet. Parasitol.*, 163, 293–297.

Khandelwal N., Shaw J., Jain M.K., 2008. Biliary parasites: diagnostic and therapeutic strategies. *Curr. Treat. Options gastroenterol.*, 11(2):85-95.

Koopman J.J., 1968. Waarnemingen omtrent de leverbotbestrijding bij rindvee. *Vet. Med. Diss.*, Utrecht.

Krull W.M., 1958. The migratory route of the metacercarie of *Dicrocoelium dendriticum* (Rudolphi, 1819) Looss, 1899 in the definitive host: dicrocoeliidae. *Cornell Vet.*, 48, 17–24.

Lacey E., Brady R.L., Prichard R.K., Watson T.R., 1987. Comparison of inhibition of polymerisation of mammalian tubulin and helminth ovicidal activity by benzimidazole carbamates. *Vet. Parasitol.* 23, 105–119. Lane, G., 1998. Anthelmintic resistance. *Vet. Rec.*, 143, 232.

Lubega G., Prichard R., 1991. B-Tubulin and benzimidazole resistance in the sheep nematode *Haemonchus contortus*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 47, 129–137.

Lucius R., 1981. Untersuchungen zur Biologie, Pathologie und Ökologie von *Dicrocoelium hospes* Looss, 1907 (Trematodes, Dicrocoeliidae). Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften vorgelegt der Fakultät II (Biologie) der Universität Hohenheim, 107.

Luzon-Peña M., Rojo-Vazquez F.A., Gomez-Bautista M., 1992. The overwintering of *Fasciola hepatica* eggs under semi-arid and temperate Mediterranean climate (Madrid, Spain). *J. Vet. Med. Ser., B* 39, 369–375.

Luzon-Peña M., Rojo-Vazquez F.A., Gomez-Bautista M., 1994. The overwintering of eggs, interamolluscal stages and metacercariae of *Fasciola hepatica* under the temperatures of a Mediterranean areas (Madrid, Spain). *Vet. Parasitol.*, 55, 143–148.

Mage C., Bourgne H., Toullieu J.M., Rondelaud D., Dreyfuss G., 2002. *Fasciola hepatica* and *Paramphistomum daubneyi*: changes in prevalences of natural infections in cattle and in *Lymnaea truncatula* from central France over the past 12 years. *Vet. Res.*, 33, 439–447.

Malek A.E., 1980. Occurrence of *Dicrocoelium hospes* in Mali and Senegal, west Africa. *J. Helminthol.*, 54, 45–46.

Manga Y., Gonzalez-Lanza C., Del Pozo P., Hidalgo R., 1990. Kinetics of *Fasciola hepatica* egg passage in the faeces of sheep in the Porma basin, Spain. *Acta Parasitol.*, 35, 149–157.

Manga-González M.Y., 1987. Some aspects of the biology and helminthofauna of *Helicella (Helicella) itala* (Linnaeus, 1758) (Mollusca). Natural infection by Dicrocoeliidae (Trematoda). *Rev. Ib. Parasitol. Vol. extra-ordinario*, 131–148.

Manga-González M.Y., González-Lanza C., Del-Pozo P., 1991. Dynamics of the elimination of *Dicrocoelium dendriticum* (Trematoda, Digenea) eggs in the faeces of lambs and ewes in porma basin (Leòn, Nw Spain). *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 66, 57–61.



Manga-González M.Y., González-Lanza C., Cabanas E., Campo R., 2001. Contributions to and review of dicrocoeliosis, with special reference to the intermediate hosts of *Dicrocoelium dendriticum*. *Parasitology*, 123, 91–114.

Manga-Gonzalez M.Y., Ferreras M.C., Campo R., Gonzalez-Lanza C., Perez V., Garcia Marin J.F., 2004. Hepatic marker enzymes, biochemical parameters and pathological effects in lambs experimentally infected with *Dicrocoelium dendriticum*. *Parasitol. Res.*, 93, 344–355.

Maplestone P.A., 1923. A revision of the Amphistomata of mammals. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 17, 113-212.

Marcilla A., Bargues M.D., Mas-Coma S., 2002. A PCR-RFLP assay for the distinction between *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*. *Mol. Cell Probes*, 16, 327–343.

Marcos L.A., Terashima A., Gotuzzo E., 2008. Update on hepatobiliary flukes: fascioliasis, opisthorchiasis and clonorchiasis. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 21, 523–530.

Marriner S.E., Bogan J.A., 1980. Pharmacokinetics of albendazole in sheep. *Am. J. Vet. Res.*, 41, 1126–1129.

Martínez Gómez F., Hernández Rodríguez S., 1971. Helminth parasites from sheep (*Ovis aries*) in Cordoba (Spain). *Arch. Zootec.*, 20, 249.

Mas-Coma S., Bargues M.D., 1997. Human liver flukes: a review. *Res. Rev. Parasitol.*, 57, 145–218.

Mas-Coma Bargues, M.D., Valero M.A., 2005. Fascioliasis and other plantborne trematode zoonoses. *Int. J. Parasitol.*, 35, 1255–1278.

McConville M., Brennan G.P., Flanagan A., Edgar H.W., Castillo R., Hernandez-Campos A., Fairweather I., 2009. Ultrastructural changes to the tegumental system and the gastrodermal cells in adult *Fasciola hepatica* following in vivo treatment with the experimental fasciolicide, compound alpha. *Parasitology* 136, 665–680.

McGonigle L., Mousley A., Marks N.J., Brennan G.P., Dalton J.P., Spithill T.W., Day T.A., Maule A.G., 2008. The silencing of cysteine proteases in *Fasciola hepatica* newly excysted juveniles using RNA interference reduces gut penetration. *Int. J. Parasitol.*, 38, 149–155.

McKellar Q., Scott E., 1990. The benzimidazole anthelmintic agents: a review. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, 13, 223–247.

Meaney M., Allister J., McKinstry B., McLaughlin K., Brennan G.P., Forbes A.B., Fairweather I., 2006. *Fasciola hepatica*: morphological effects of a combination of triclabendazole and clorsulon against mature fluke. *Parasitol. Res.*, 99, 609–621.

Meaney M., Allister J., McKinstry B., McLaughlin K., Brennan G.P., Forbes A.B., Fairweather I., 2007. *Fasciola hepatica*: ultrastructural effects of a combination of triclabendazole and clorsulon against mature fluke. *Parasitol. Res.*, 100, 1091–1104.

Medley G.F., 1994. Chemotherapy. In: Scott, M.E., Smith, G. (Eds.), *Parasitic and Infectious Diseases: Epidemiology and Ecology*. Academic Press, San Diego, 141–157.

Meeusen E., Lee C.S., Rickard M.D., Brandon M.R., 1995. Cellular responses during liver fluke infection in sheep and its evasion by the parasite. *Parasite Immunol.*, 17, 35–45.

Mikhailova et al., 1972, citato da Euzéby J., 1975. *Les maladies vermineuses des animaux domestiques et leurs incidences sur la pathologie humaine*. Tomo II, *Maladies dues aux plathelminthes, troisième fascicule: trematodes*, livre 2, Vigot Freres Editeurs, Paris, 37.

Mitchell G.B., Maris L., Bonniwell M.A., 1998. Triclabendazole-resistant liver fluke in Scottish sheep. *Vet. Rec.* 143, 399. Moll, L., Gaasenbeek, C.P., Vellema, P., Borgsteede, F.H., 2000. Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle and sheep in The Netherlands. *Vet. Parasitol.*, 91, 153–158.

Morrison C.A., Colin T., Sexton J.L., Bowen F., Wicker J., Friedel T., Spithill T.W., 1996. Protection of cattle against *Fasciola hepatica* infection by vaccination with glutathione S-transferase. *Vaccine* 14, 1603–1612.

Mottier M., Alvarez L., Pis A., Lanusse C., 2003. Transtegumental diffusion of benzimidazole anthelmintics into *Moniezia benedeni*, correlation with their octanol-water partition coefficients. *Exp. Parasitol.*, 103, 1–7.

Mottier M., Virkel G., Solana H., Alvarez L., Salles J., Lanusse C., 2004. Triclabendazole biotransformation and comparative diffusion of the parent drug and its oxidised metabolites into *Fasciola hepatica*. *Xenobiotica*, 34, 1043–1057.

- Mottier M., Alvarez L., Ceballos L., Lanusse C., 2006. Drug transport mechanisms in helminth parasites: passive diffusion of benzimidazole anthelmintics. *Exp. Parasitol.*, 113, 49–57.
- Mukaratirwa S., Brand A., 1999. *Fasciola (Tenuifasciola) tragalphi* (Pike and Condry, 1966) in a beef cow, a new record. *Zimbabwe Vet. J.*, 30, 67–69.
- Munguia-Zochihua J.A., Ibarra-Velarde F., Ducoing-Watty A., Montenegro-Cristino N., Quiroz-Romero H., 2007. Prevalence of *Fasciola hepatica* (ELISA and fecal analysis) in ruminants from a semi-desert area in the northwest of Mexico. *Parasitol. Res.*, 101, 127–130.
- Murray M., Rushton B., 1975. The pathology of fascioliasis, with particular reference to hepatic fibrosis. In: Taylor, A.E.R., Muller, R. (Eds.), *Pathogenic Processes in Parasitic Infections*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 27–41.
- Musella V., Catelan D., Rinaldi L., Lagazio C., Cringoli G., Biggeri A., 2011. Covariate selection in multivariate spatial analysis of ovine parasitic infection. *Prev. Vet. Med.*, 99, 69–77.
- Nansen P., Eriksen L., Flagstad T., 1975. Immunoglobulins in *Fasciola hepatica* infected ruminants. In: Over, H.J., Armour, J. (Eds.), *Facts and Reflections. Workshop on Fascioliasis*, Lelystad, vol. 2, 65–72.
- Näsmark K.E., 1937. Revision of the trematode family Paramphistomidae. *Zoologiska Bidrag fran Upsala*, 16, 301–565.
- O'Brien, J.J., 1970. Toxicological aspects of some modern anthelmintics. *Aust. Vet. J.*, 46, 297–300.
- O'Brien D.J., 1998. Fasciolosis: a threat to livestock. *Irish Vet. J.*, 51, 539–541.
- Ollerenshaw C.B., Smith L.P., 1969. Meteorological factors and forecasts of helminthic disease. *Adv. Parasitol.*, 7, 283–323.
- Onar E., 1990. Efficacy of thiophanate and albendazole against natural infections of *Dicrocoelium dentriticum*, *Fasciola hepatica*, and gastrointestinal nematodes and cestodes in sheep. *Vet. Parasitol.*, 35, 139–145.

O'Neill J.F., Johnston R.C., Halferty L., Brennan G.P., Keiser J., Fairweather I., 2009. Adult triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*: morphological changes in the tegument and gut following in vivo treatment with artemether in the rat model. *J. Helminthol.*, 83, 151–163.

Otranto D., Traversa D., 2002. A review of dicrocoeliosis of ruminants including recent advances in the diagnosis and treatment. *Vet. Parasitol.*, 107, 317–335.

Ouellette M., 2001. Biochemical and molecular mechanisms of drug resistance in parasites. *Trop. Med. Int. Health*, 6, 874–882.

Overend D.J., Bowen F.L., 1995. Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole. *Aust. Vet. J.*, 72, 275–276.

Pantelouris E.M., 1965. The common liver fluke *Fasciola hepatica*. Pergamon Press, London, United Kingdom.

Paraud C., Fournier E., Robergeot V., Kulo A., Pors I., Baudry C., Chartier, 2009. *Calicophoron daubneyi* infection in grazing goats: Results from a cross-sectional coprological survey in France. *Small Ruminant Research*, 82, 66–68.

Pecheur H., 1967. A few considerations on the cercariae and metacercariae of *Fasciola hepatica*, 2nd Int. Liver Fluke Colloquium 2–6 October 1967. Department of Zoology, Agricultural University, Wageningen. Merck, Rahway, NJ. The Netherlands, 148–149.

Piedrafita D., Raadsma H., Prowse R., Spithill T.W., 2004. Immunology of the host parasite relationship in Fasciolosis (*Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*). *Can. J. Zool.*, 82, 233–250.

Piergili Fioretti D., Baldelli B., Ambrosi M., Polidori G.A., Moretti A., 1980. Il metodo ELISA per la ricerca di anticorpi in ovini parassitati da *Dicrocoelium dendriticum*. *Rivista di Parassitologia*, 3, 289–292.

Pike A.W., Condy J.B., 1966. *Fasciola tragelaphi* sp. Nov. from the sitatunga, *Tragelaphus spekei Rothschild*, with a note on the prepharyngeal pouch in the genus *Fasciola*. *Parasitology*, 56, 511–520.

Pleasant J., Raadsma H.W., Estuningsih S.E., Widjajanti S., Meeusen E., Piedrafita D., 2011. Innate and adaptive resistance of Indonesian thin tail sheep to liver fluke. A

comparative analysis of *Fasciola gigantica* and *Fasciola hepatica* infection. *Vet. Parasitol.*, 178, 264–272.

Poglayen G., Capelle G., Martini M., Zampiccoli R., 1995. Epidemiologie della parassitosi dell'apparato digerente del bovino nella provincia autonoma di Trento. *Atti. Soc. It. Buiatria*, 27, 483–489.

Poulin R., 2006. Global warming and temperate-mediated increases in cercarial emergence in trematode parasites. *Parasitology*, 132, 143–151.

Pouliot J., Liheureux F., Liu Z., Prichard R., Georges E., 1997. Reversal of Pglycoprotein associated multidrug resistance by ivermectin. *Biochem. Pharmacol.*, 53, 17–25.

Prichard R.K., Hennessy D.R., 1981. Effect of oesophageal groove closure on the pharmacokinetic behaviour and efficacy of oxfendazole in sheep. *Res. Vet. Sci.* 30(1), 22-27.

Quiroz-Romero H., Campo R., Manga-Gonzalez M.Y., 1996. Valoracion de modelos quimioterapeuticos en el control de *Dicrocoelium dendriticum* en ganado ovino en la provincia de Leon, España. Memoria de la Reunion Nacional de Investigacion Pecuaria, Morelos, Cuernavaca. Mexico, 85.

Raccioppi O., Lombardero O., Moriena R., 1995. *Cotylophoron cotylophorum* (Fischer, 1901) (Trematoda, Paramphistomidae), a new bovine parasite in Argentina. *Rev. Med. Vet.*, 75, 228–229.

Rahko T., 1960. The pathology of natural *Fasciola* infection in cattle. *Path. Vet.*, 6, 244-256.

Rehbein S., Visser M., 1999. Efficacy of an injectable ivermectin/clorsulon combination against *Fasciola hepatica* in sheep. *Vet. Rec.*, 145, 468.

Reid J.F.S., 1973. Fascioliasis: clinical aspects in diagnosis. In: Urquhart, G.M., Amour, J. (Eds.), *Helminth Diseases of Cattle, Sheep and Horses in Europe*. Robert MacLehose. The University Press, Glasgow, 81–86.

Reinecke R.K., 1983. *Veterinary Helminthology*. Butterworths, Durban.

Richter J., Freise S., Mull R., Millan J., 1999. Fascioliasis: sonographic abnormalities of the biliary tract and evolution after treatment with triclabendazole. *Trop. Med. Int. Health*, 4, 774–781.

Rieu E., Recca A., Bènet J.J., Saana M., Dorchies P., Guillot J., 2007. Reliability of coprological diagnosis of *Paramphistomum* sp. infection in cows. *Veterinary Parasitology*, 146, 249–253

Rinaldi L., Perugini A.G., Capuano F., Fenizia D., Musella V., Veneziano V., Cringoli G., 2005. Characterization of the second internal transcribed spacer of ribosomal DNA of *Calicophoron daubneyi* from various hosts and locations in southern Italy. *Vet Parasitol.*, 131, 247-253.

Robinson M.W., Trudgett A., Hoey E.M., Fairweather I., 2003. The effect of the microtubule inhibitor tubulazole-C on the tegument of triclabendazole-susceptible and triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*. *Parasitol. Res.*, 91, 117–129.

Robinson M.W., Dalton J.P., Donnelly S., 2008. Helminth pathogen cathepsin proteases: it's a family affair. *Trends Biochem. Sci.*, 33, 601–608.

Robinson M.W., Menon R., Donnelly S.M., Dalton J.P., Ranganathan S., 2009. An integrated transcriptomics and proteomics analysis of the secretome of the helminth pathogen *Fasciola hepatica*: proteins associated with invasion and infection of the mammalian host. *Mol. Cell. Proteom.*, 8, 1891–1907.

Rojo-Vazquez F.A., Cordero-Del-Campillo M., Diez-Baños P., Chaton-Schaffner M., 1981. Relation existant entre le nombre d'oeufs dans les feces et la charge parasitaire lors des infestations naturelles a *Dicrocoelium dendriticum* chez les ovins. *Rev. Med. Vet.*, 132, 601–607.

Rojo-Vazquez F.A., Ferre-Perez I., 1999. Fasciolosis. Cordero del Campillo M., Rojo-Vazquez F.A. (Eds.), *Parasitologia Veterinaria*. McGraw Hill Interamericana, Madrid, 260-272.

Rojo-Vázquez F.A., Meana A., Valcárcel F., Martínez-Valladares M., 2012. Update on trematode infections in sheep. *Veterinary Parasitology*, 189, 15-38.

Rolfe P.F., Boray J.C., 1987. Chemoterapy of paramphistomosis in sheep. *Aust. Vet. J.*, 65, 148–150.

Rolfe P.F., Boray J.C., 1993. Comparative efficacy of moxidectin, an ivermectin/clorsulon combination and closantel against immature paramphistomes in cattle. *Aust. Vet. J.*, 70, 265–267.

Rolfe P.F., Boray J.C., Collins G.H., 1994. Pathology of infection with *Paramphistomum ichikawai* in sheep. *Int. J. Parasitol.*, 24, 995–1004.

Ross J.G., 1977. A five-year study of the epidemiology of fascioliasis in the north, east and west of Scotland. *Br. Vet. J.*, 133, 263–272.

Rowlands D.T., Clampitt R.B., 1979. Plasma enzyme levels in ruminants infected with *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol.*, 5, 155–175.

Sahai B.N., Ansari M.Z., Singh R.P., Prasad K.D., 1983. Anthelmintic efficacy of ivermectin and albendazole against experimental paramphistomiasis in goats. *Indian J. Vet. Med.*, 3 (1), 27–32.

Sanchez R., Sanabria R., Romero J., 2005. Findings of *Cotylophoron cotylophorum* (Fischer, 1901) in Buenos Aires and Entre Rios provinces. *Vet. Argent.*, 22, 111–116.

Sanchez-Andrade R., Paz-Silva A., Suarez J., Panadero R., Diez-Baños P., Morrondo P., 2000. Use of a sandwich-enzyme-linked immunosorbent assay (SEA) for the diagnosis of natural *Fasciola hepatica* infection in cattle from Galicia (NW Spain). *Vet. Parasitol.*, 93, 39–46.

Sanchez-Andrade R., Paz-Silva A., Suarez J.L., Arias M., Lopez C., Morrondo P., Scala A., 2003. Serum antibodies to *Dicrocoelium dendriticum* in sheep from Sardinia (Italy). *Prev. Vet. Med.*, 57, 1–5.

Sandoval H., Manga-Gonzalez M.Y., Campo R., Garcia P., Sanchez-Campos S., González P., Ferreras C., Garcia Jeglesias M.J., González Gallego J., Tunon M.J., 2000. Morphologic and biochemical changes caused by experimentally induced dicrocoeliosis in hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Comp. Med.*, 50, 147–152.

Sanna E., Garippa G., Asoni G., 1989. Attuale diffusione delle parassitosi ovine in Sardegna. *Atti SISVET*, 43, 1299-1302.

Sanna G., Laconi P., Varcasia A., Serra S., Pipia A.P., Dore F., Maurelli M.P., Cringoli G., Scala A., 2012. Cattle Paramphistomosis: taxonomical, epidemiological updates in Sardinia and therapeutic field trials. *Mappe Parassitologiche*, 18, 88.

Sanz F., Tarazona J.M., Jurado R., Frías J., Tarazona J.V., Duncan J.L., 1987. An evaluation of the efficacy of netobimin against *Dicrocoelium dendriticum* in sheep. *Vet. Rec.*, 17, 57–58.

Savitskii I.G., Ponomareva A.M., 1984. Diagnosis of ovine dicrocoeliasis by the ELISA (in Russian). *Veterinariya*, 1, 43–44.

Scala A., 1991. Dicrocoeliosi ovina in Sardegna: tassi di prevalenza, lesioni anatomico-istopatologiche e tests ematochimici. *Atti FEMESPRUM*, 1, 209-214.

Scala A., 2006. L'esame parassitologico diretto e la sua razionale applicazione. *Atti SIPAOC*, 17, 134-137.

Scala A., Bitti P.L., Fadda M., Pilia A., Varcasia A., 1999. I trattamenti antiparassitari negli allevamenti ovini della Sardegna. *Proceedings 7° Congress Of Mediterranean Federation For Health And Production Of Ruminants*, 267-272.

Scala A., Espa A., Miculan A., Barbieri A., 2000. A parasitological survey on sheep slaughtered in the province of Cagliari (Italy). *Book of proceedings 8th International Congress FEMESPRUM*, 8, 239-243.

Scala A., Nieddu M.S., Urrai G., Maricosu G., Contini L., Polinas L., Tanda B., Basciu M., Sanna-Coccone G.N., Fiori I., Pilo C., 2006. Evaluation of the efficacy of anthelmintic treatments against sheep gastro-intestinal nematodes in Sardinia. *Parassitologia*, 48(1-2), 199.

Schuster, R., 1991. Factors influencing the metacercarial intensity in ants and the size of *Dicrocoelium dendriticum* metacercarial cysts. *J. Helminthol.*, 65, 275–279.

Schröder L., Geyer E., 1976. Experimentelle Dicrocoeliose: Bildung Humoraler Antikörper Beim Goldhamster (*Mesocricetus auratus*, waterhouse). *Behring Inst. Mitt.*, 60, 24–37.

Scott P.R., Sargison N.D., Macrae A., Rhind S.R., 2005. An outbreak of subacute fasciolosis in Soay sheep: ultrasonographic biochemical and histological studies. *Vet. J.*, 170, 325–331.

Senlik B., Cirak V.Y., Muz M., Tinar R., 2006. Changes in faecal egg counts at different hours of the day and relationship between faecal egg count and parasite burden in sheep naturally infected with *Dicrocoelium dendriticum*. *Turk. J. Anim. Vet. Sci.*, 30, 107–111.

Sexton J.L., Milner A.R., Panaccio M., Waddington J., Wijfels G., Chandler D., Thompson C., Wilson L., Spithill T.W., Mitchell G.F., Campbell N.J., 1990. Glutathione S-transferase, novel vaccine against *Fasciola hepatica* infection in sheep. *J. Immunol.*, 145, 3905–3910.

Sey O., 1991. *Handbook of the Zoology of Amphistomes*. CRC Press, Boca Ratón, Florida.



Sey O., Arru E., 1977. A review of species of *Paramphistomum* (fishoeder, 1901 occurring in Sardinian domestic ruminants. *Rivista di Parassitologia*, 38(2/3), 295-301.

Shaka S., Nansen P., 1979. Epidemiology of fascioliasis in Denmark. Studies on the seasonal availability of metacercariae and the parasite stages overwintering on pasture. *Vet. Parasitol.*, 5, 145–154.

Silvestre A., Sauve C., Cabaret J., 2000. Caprine *Paramphistomum daubneyi* (Trematoda) infection in Europe. *Vet. Rec.*, 146, 674–675.

Simón Vicente F., 1966. Las helmintosis ovinas en el pastoreo extensivo. *Rev. Ibér. Parasitol.*, 26, 203–222.

Sinclair K.B., 1972. The pathogenicity of *Fasciola hepatica* in pregnant sheep. *Br. Vet. J.*, 128, 249–259.

Skrjabin K.I., 1949. Trematodes of animals and man. Principles of Trematodology. Vol. III, Moscow: Izdatelstvo Akademii Nauk SSSR (In Russian).

Somvanshi R., Kaul G.L., 1989. Dicrocoeliasis in pashima goats. *Ind. Vet. Med. J.*, 13, 42–43.

Sotiraki S.T., Leontides L.S., Himonas C.A., 1999. The effect of transportation and confinement stress on egg production by *Dicrocoelium dendriticum* in sheep. *J. Helminthol.*, 73, 337–339.

Soulsby E.J.L., 1968. Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals, 6th Edition. Baillière, London, 24–26.

Southwell T. & Kirshner A., 1937. A description of a new species of amphistome. *Chiorchis purvisi*, with notes on the classification of the genera within the group. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 31, 215-244.

Spence S.A., Fraser G.C., Chang S., 1996. Responses in milk production to control of gastrointestinal nematode and paramphistome parasites in dairy cattle. *Aust. Vet. J.*, 74, 456–459.

Stiles C.W., & Goldberger J., 1910. A study of the anatomy of *Watsonius* (n.g.) *watsoni* of man and of nineteen allied species of mammalian trematode worms of the superfamily

Paramphistomoidea. Bulletin of the Hygienic Laboratory, Public Health and Marine-Hospital Service of the United States, 60, 259

Stunkard H.W., 1917. Studies on North American Polystomidae, Aspidogastridae, and Paramphistomidae. Illinois Biological Monographs, 3, 285-394.

Stunkard H.W., 1925. The present status of the amphistome problem. Parasitology, 17, 137-148.

Sunita K., Singh D.K., 2011. Fascioliasis control: in vivo and in vitro phytotherapy of vector snail to kill *Fasciola* larva. J. Parasitol. Res., <http://dx.doi.org/10.1155/2011/240807>.

Sykes A.R., Coop R.L., Rushton B., 1980a. Chronic subclinical fascioliasis in sheep: effects on food intake, food utilisation and blood constituents. Res. Vet. Sci. 28, 63-70.

Sykes A.R., Coop R.L., Rushton B., 1980b. Chronic subclinical ovine fascioliasis: plasma glutamate dehydrogenase, gammaglutamyltranspeptidases and aspartate aminotransferase activities and their significance as diagnostic aids. Res. Vet. Sci., 28, 71-75.

Symons L.E.A., 1985. Anorexia: occurrence, pathophysiology and possible causes in parasitic infections. Adv. Parasitol., 24, 103-133.

Szidat L., 1939. Beiträge zum Aufbau eines natürlichen Systems der Trematoden. I. Die Entwicklung von *Echinocercaria choanophila* U. Szidatzu *Cathaemasia hians* und die Ableitung der Fasciolidae von Echinostomidae. Zeitschrift für Parasitenkunde, 11, 239-283.

Szmidt-Adjidé V., Abrous M., Adjidé C.C., Dreyfuss G., Lecompte A., Cabaret J., Rondelaud D., 2000. Prevalence of *Paramphistomum daubneyi* infection in cattle in central France. Vet. Parasitol., 87, 133-138.

Tamura K., and Nei M., 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. Molecular Biology and Evolution 10, 512-526.

Tanda S., Arru E., 1963. Sul problema della distomatosi epatica dei bovini e degli ovini in Sardegna. Studi Sassaresi, 41, 520-533.

Tang C., Tang Z., Tang L., Cui Q., Lu H., Qian Y., 1983. Studies on the biology and epizootics of *Dicrocoelium chinensis* in the eastern Inner Mongol Autonomous region. *Acta Zool. Sin.*, 29, 340–349.

Taylor E.L., 1964. Fascioliasis and the liver fluke. Food and agriculture organization of the United nations, Rome, 1–234.

Taylor M.A., 2012. Emerging parasitic diseases of sheep. *Veterinary Parasitology*, 189, 2-7.

Taylor S.M., 1989. Control of fasciolosis in the British Isles. *Magy. Allatorv. Lapja*, 44, 651–655.

Theodorides V.J., Carakostas M.C., Colaianne J.J., Freeman J.F., Page S.W., 1993. Safety of albendazole in developing bovine fetuses. *Am. J. Vet. Res.*, 54(12), 2171-2174.

Theodoridis Y., Duncan J.L., MacLean J.M., Himonas C.A., 1991. Pathophysiological studies on *Dicrocoelium dendriticum* infection in sheep. *Vet. Parasitol.* 39, 61–66.

Thompson R.C.A., 2004. Advances in the diagnosis and systematic of parasites of veterinary importance: new and exciting prospects. In: Gasser, R.B., Zarlenga, D.S. (Eds.), *Molecular systematics and diagnosis*, *Vet. Parasitol.*, 125, 69–92.

Toner E., McConvery F., Brennan G.P., Meaney M., Fairweather I., 2009. A scanning electron microscope study on the route of entry of triclabendazole into the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Parasitology*, 136, 523–535.

Torgerson P., Claxton J., 1998. *Epidemiology and control Fasciolosis*. Dalton, J.P. (Ed.), CABI Publishing, Oxon, UK, 113–149.

Travassos L., 1934. *Synopse dos Paramphistomoidea*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 29, 19-178.

Urquhart G.M., Armour J., Doyle J., Jennings F.W., 1970. Studies on ovine fasciolosis. III The comparative use of molluscicide and anthelmintic in the control of the disease. *Vet. Record.*, 86, 338–345.

Urquhart G.M., Armour J., Duncan J.L., Dunn A.M., Jennings F.W., 1998. *Parassitologia Veterinaria*, UTET, Torino.

Vara-del Rio M.P., Martinez-Valladares M., Cruz-Rojo M.A., Rojo- Vazquez F.A., 2005a. Evolution of Fluckicide Resistance in a Sheep Flock from Northwest of Spain, 6th International Sheep Veterinary Congress, Hersonissos, Crete, Greece.

Vara-del Rio M.P., Martinez-Valladares M., Cruz-Rojo M.A., Perez-Garcia J., Rojo-Vazquez F.A., 2005b. Sobre la metodologia de estudio de resistencias a fasciolicidas en los ovinos , IX Congresso Iberico de Parasitologia, Coimbra, Portugal.

Vara del Rio M.P., Villa H., Martinez-Valladares M., Rojo-Vazquez F.A., 2007. Genetic heterogeneity of *Fasciola hepatica* isolates in the northwest of Spain. Parasitol. Res., 101, 1003–1006.

Venditti G., Grelloni V., Filippini G., 2010. Applicazione dei Sistemi Informatici Geografici (GIS) per la definizione di mappe parassitologiche nelle regioni Umbria e Marche: indagine sulle endoparassitosi ovine. Webzine Sanità Pubblica Veterinaria, 60, 28-33.

Veneziano V., Santaniello M., Schippi M., Morgoglione M.E., Rufrano D., Cringoli G., 2006. Field trial on the efficacy of netobimin against *Dicrocoelium dendriticum* in naturally infected sheep. Parassitologia, 48(1-2), 202.

Vercruyse J., Taraschewski H., Voigt W.P., 1998. Main clinical and pathological signs of parasitic infections in domestic animals. In: Mehlhorn, H. (Ed.), Parasitology in Focus. Springer-Verlag, New York, 477–532.

Walker S.M., Johnson C., Hoey E.M., Fairweather I., Borgsteede F.H.M., Gaasenbeek C.P.H., Prodohl P.A., Trudgett A., 2010. Potential role of hares in the spread of liver fluke in the Netherlands. Vet. Parasitol., 177, 179–181.

Wenker C., Hatt J.M., Hertzberg H., Ossent P., Hanichen H., Branck A., Isenbùgel E., 1998. Dikrozoliose bei neuweltkameliden. Tierärztl. Prax., 26, 355–361.

Wolff K., Hauser B., Wild P., 1984. Dicrocoeliose des schafes: untersuchungen zur pathogenese und zur regeneration der laber nach therapie. Berl. Münch Tierärztl. Wschr., 97, 378–387.

Wolstenholme A., Fairweather I., Prichard R., von Samson- Himmelstjerna G., Sangster N., 2004. Drug resistance in veterinary parasites. Trends Parasitol., 20, 469–476.

Wood I.B., Amaral N.K., Bairden K., Duncan J.L., Kassai T., Malone J.B., Jr., Pankavich J.A., Reinecke R.K., Slocombe O., Taylor S.M., Vercruysse J., 1995. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine), *Veterinary Parasitology*, 58, 181-213.

Xu M., Molento M., Blackhall W., Ribeiro P., Beech P., Prichard R., 1998. Ivermectin resistance in nematodes may be caused by alteration of P-glycoprotein homolog. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 91, 327-335.

Yamaguti S., 1958. *Systema Helminthum*. Vol. I, Digenetic trematodes of vertebrates, Parts I & II, New York & London: Interscience Publishers.

Yamaguti S., 1971. *Synopsis of Digenetic Trematodes of Vertebrates 1 and 2*. Keigaku Publishing Co., Tokyo, Japan.

Zimmerman G.L., Wallace D.H., Schons D.J., Hoberg E.P., 1986. Efficacy of clorsulon against mature, naturally acquired *Fasciola hepatica* infections in cattle and sheep. *Am. J. Vet. Res.*, 47, 1665-1667.

## **9. RINGRAZIAMENTI**

*Si ringraziano per la collaborazione i Veterinari dell'ARAS Sardegna che hanno consentito la compilazione dei questionari, il Dott. Giannetto Bianco dell'ASL n°2 di Olbia e il Dott. Emanuele Mura e il Dott. Francesco Dore per l'ausilio da loro fornito nell'acquisizione dei dati rilevati al mattatoio e la Dott.ssa Anna Paola Pipia per il contributo fornito per l'attuazione delle indagini biomolecolari.*

## 10. TABELLE

<b>ID campioni</b>	<b>Anno di isolamento</b>	<b>Specie animale</b>	<b>Località</b>	<b>Identificazione morfologica</b>	<b>Materiale di conservazione del campione</b>
1	2012	Bovino	Cagliari	<i>Paramphistomum</i>	Alcool 70%
2	1968	Bovino	Nulvi	<i>Paramphistomum</i>	Formalina
3	1972	Bovino	Tula	<i>Paramphistomum</i>	Formalina
4	1975	Bovino	Cagliari	<i>Paramphistomum</i>	Formalina
5	1978	Bovino	Nulvi	<i>Paramphistomum</i>	Formalina
6	1980	Bovino	Thiesi	<i>Paramphistomum</i>	Formalina
7	2008	Bovino	Aggius	<i>Paramphistomum</i>	Materiale congelato
8	2008	Bovino	Aggius	<i>Paramphistomum</i>	Materiale congelato
9	2008	Bovino	Aggius	<i>Paramphistomum</i>	Materiale congelato
10	2008	Bovino	Aggius	<i>Paramphistomum</i>	Materiale congelato
11	2010	Ovino	Thiesi	<i>Paramphistomum</i>	Materiale congelato
12	2012	Bovino	Villanova	<i>Paramphistomum</i>	Alcool 70%
13	2012	Bovino	Paulilatino	<i>Paramphistomum</i>	Alcool 70%
14	2012	Bovino	Paulilatino	<i>Paramphistomum</i>	Alcool 70%
15	2012	Bovino	Abbasanta	<i>Paramphistomum</i>	Alcool 70%
16	2012	Bovino	Paulilatino	<i>Paramphistomum</i>	Alcool 70%
17	2012	Bovino	Tula	<i>Paramphistomum</i>	Alcool 70%
18	2012	Bovino	Sedilo	<i>Paramphistomum</i>	Alcool 70%

**Tabella n°1:** Parassiti adulti esaminati in PCR (ITS-2+) e sequenziati.

<b>Anno (n°all)</b>	<b>Fasciolosi n°all.posit.</b>	<b>Prevalenza</b>	<b>Dicroceliosi n°all.posit.</b>	<b>Prevalenza</b>	<b>Paramfistomosi n°all. posit.</b>	<b>Prevalenza</b>
2013 (154)	7	4,54%	54	35,06%	31	20,12%
2012 (109)	1	0,91%	14	12,84%	10	9,17%
2011 (118)	1	0,84%	16	13,55%	12	10,16%

**Tabella n°2-** Prevalenza nelle greggi monitorate per le diverse trematodosi stratificate per anno di prelievo

<b>Province N°allevamenti esaminati</b>	<b>Fasciolosi N°allev. positivi – Prev.</b>	<b>Dicroceliosi N°allev. positivi – Prev.</b>	<b>Paramfistomosi N°allev. positivi – Prev.</b>
<b>CAGLIARI</b>	0 – 0%	6 – 26,08%	1 – 4,34%
<b>SASSARI</b>	4 – 1,66%	44 – 18,33%	32 – 13,33%
<b>NUORO</b>	3 – 4,34%	18 – 26,08%	14 – 20,28%
<b>ORISTANO</b>	2 – 4,08%	16 – 32,65%	6 – 12,24%

**Tabella n°3:** Prevalenze nelle greggi monitorate per le diverse trematodosi stratificate per le province “storiche” della Sardegna.



SINTOMI	Numero	%
edema sottomandibolare/edema	23/39	59%
dimagrimento/deperimento	20/39	51,3%
diminuzione produzione latte	8/39	20,5%
diarrea	5/39	7,7%
ittero	2/39	5,1%
subittero	1/39	2,6%
abbattimento	1/39	2,6%
morte	1/39	2,6%
nessun sintomo	3/39	7,7%

**Tabella n°4:** Sintomi che secondo i veterinari intervistati sono riportabili alla dicroceliosi ovina

Gruppo	G 0 media UPG	G 7 media UPG	G 7 efficacia	G 14 media UPG	G 14 efficacia	G 28 media UPG	G 28 efficacia
<b>GRUPPO VERDE</b>	371,3	280,2	/	264,9	/	290,4	/
<b>GRUPPO ROSSO</b>	378,9	179,8	52,5%	187,3	50,6%	98,2	74,1%
<b>GRUPPO BLU</b>	352	164,7	53,2%	133,8	62%	62,9	82,1%

**Tabella n°5:** Valori di UPG rilevati nei diversi gruppi di ovini nel primo trial attuato nell'allevamento con sospetto di farmacoresistenza.

	<b>G 0</b>	<b>G 7</b>	<b>G 14</b>	<b>G 28</b>
<b>Rosso-Blu</b>	0,7952	0,9379	1,0000	0,1657
<b>Rosso-Verde</b>	1,0000	0,0031	0,0083	0,0002
<b>Blu- Verde</b>	0,7292	0,0133	0,0036	0,0000

**Tabella n°6:** Confronto delle medie di UPG con il test di Mann-Whitney rilevate nei gruppi di ovini del primo trial attuato nell'allevamento con sospetto di farmaco resistenza (in rosso i valori significativi)

<b>Gruppo</b>	<b>G 0 media UPG</b>	<b>G 7 media UPG</b>	<b>G 7 efficacia</b>	<b>G 14 media UPG</b>	<b>G 14 efficacia</b>	<b>G 21 media UPG</b>	<b>G 21 efficacia</b>	<b>G 28 media UPG</b>	<b>G 28 efficacia</b>
<b>GRUPPO VERDE</b>	180,9	239,5		235,4		202,1		135,7	
<b>GRUPPO BLU</b>	206,7	102,3	50,5%	77,7	69,7%	63,3	69,4%	78,6	62%
<b>GRUPPO ROSSO</b>	235,8	113,4	51,9%	97,2	58,8%	97,2	58,8%	96	59,3%

**Tabella n°7:** Valori di UPG rilevati nei diversi gruppi di ovini nel secondo trial attuato nell'allevamento con sospetto di farmacoresistenza

	<b>G 0</b>	<b>G 7</b>	<b>G 14</b>	<b>G 21</b>	<b>G 28</b>
<b>Verde-blu</b>	0,1042	0,0149	0,0023	0,0128	0,0446
<b>Rosso-verde</b>	0,1437	0,0881	0,0470	0,1721	0,5140
<b>Rosso-blu</b>	0,6127	0,9294	0,6435	0,5816	0,5959

**Tabella n° 8:** Confronto delle medie di UPG con il test di Mann-Whitney rilevate nei gruppi di ovini del secondo trial attuato nell'allevamento con sospetto di farmaco resistenza (in rosso i valori significativi)

Protocollo	G -7	G 0	G 7*		G 14	
	Media UPG	Media UPG	Media UPG	efficacia	Media UPG	efficacia
<b>P1</b>						
<b>All. A -CONTROLLO</b>	153	317,5	97,1	/	159	/
<b>All. A CYD+VALB 1,9%®</b>	108	256	234,7	8,3%	248,8	2,8%
<b>All. B CONTROLLO</b>	30,0	10,8	13,2	/	18	/
<b>All. B CYD+VALB 1,9%®</b>	25,2	30,6	13,8	54,9%	4,8	84,3%
<b>All. C CONTROLLO</b>	45,0	4,8	22,5	/	18	/
<b>All. C CYD+VALB 1,9%®</b>	43,2	60,7	88,7	**	24	60,5%
<b>All. D CONTROLLO</b>	450	436,5	/	/	226,8	/
<b>All. D CYD+VALB 1,9%®</b>	498	228	81,6	64,2%	128,6	43,6%
<b>All. G CONTROLLO</b>	116	86,4	69	/	195,6	/
<b>All. G CYD+VALB 1,9%®</b>	144	19,8	67,8	**	51,6	**

**Tabella n°9:** Valori di UPG rilevati negli allevamenti in cui è stato applicato il protocollo P1 insieme alla percentuale di efficacia rilevata a G 7 e G 14 (\* giorno della ripetizione del trattamento con albendazolo \*\* nessuna efficacia)

Protocollo	G 0	G 14		G 21		G 28	
		Media UPG	Media UPG	efficacia	Media UPG	efficacia	Media UPG
<b>P2</b>							
<b>All. D CONTROLLO</b>	498	412,5	/	226,8	/	274,5	/
<b>All. D VALB 1,9%®</b>	412,5	139,3	66,2%	47,5	88,5%	51	87,6%
<b>All. G CONTROLLO</b>	144	86,4	/	69	/	195,6	/
<b>All. G VALB 1,9%®</b>	86,4	78	9,7%	108	**	168	**

**Tabella n°10:** Valori di UPG rilevati negli allevamenti in cui è stato applicato il protocollo P2 insieme alla percentuale di efficacia rilevata a G 14, G 21 e G 28 (\*\* nessuna efficacia)

Protocollo	G 0	G 14		G 21		G 28	
		Media UPG	Media UPG	efficacia	Media UPG	efficacia	Media UPG
<b>P3</b>							
<b>All. D CONTROLLO</b>	498	/	/	226,8	/	274,5	/
<b>All. D VALB 10%®</b>	412,5	220,4	46,6%	104,8	74,6%	94,4	77,1%
<b>All. E CONTROLLO</b>	326	70,7	/	64,4	/	44,4	/
<b>All. E VALB 10%®</b>	70,7	30,4	57%	18,4	74%	44,8	36,6%
<b>All. F CONTROLLO</b>	268	374	/	228,8	/	649,6	/
<b>All. F VALB 10%®</b>	374	205,8	45%	33,2	91,1%	207,2	44,6%

**Tabella n°11:** Valori di UPG rilevati negli allevamenti in cui è stato applicato il protocollo P3 insieme alla percentuale di efficacia rilevata a G 14, G 21 e G 28

Protocollo	G 0	G 14		G 21		G 28	
	Media UPG	Media UPG	efficacia	Media UPG	efficacia	Media UPG	efficacia
<b>P4</b>							
<b>All. D CONTROLLO</b>	498	412,5	/	226,8	/	274,5	/
<b>All. D VALB 10%® (doppio dosaggio)</b>	412,5	4,3	98,9%	9,2	97,8%	8,7	97,9%
<b>All. F CONTROLLO</b>	326	70,7	/	64,4	/	44,4	/
<b>All. F VALB 10%® (doppio dosaggio)</b>	374	13,2	96,5%	14,8	96,0%	37,6	89,9%

**Tabella n°12:** Valori di UPG rilevati negli allevamenti in cui è stato applicato il protocollo P4 insieme alla percentuale di efficacia rilevata a G 14, G 21 e G 28

Gruppo	G 0 UPG	G 7 UPG	G 7 efficacia	G 14 UPG	G 14 efficacia	G 28 UPG	G 28 efficacia
<b>GRUPPO VERDE</b>	214	316	/	538	/	391	/
<b>GRUPPO ROSSO</b>	273	28	89,7%	42	84,6%	41	85%
<b>GRUPPO BLU</b>	422	3	99,3%	14	96,7%	23	94,5%

**Tabella n°13:** Valori di UPG e relativa efficacia dei trattamenti dei diversi gruppi di ovini nei vari giorni del monitoraggio per la valutazione dell'efficacia dell'ossiclozanide+levamisolo.

	<b>G 0</b> valore di P	<b>G 7</b> valore di P	<b>G 14</b> valore di P	<b>G 28</b> valore di P
<b>Rosso-Blu</b>	0,7952	0,9379	1,0000	0,1657
<b>Rosso-Verde</b>	1,0000	0,0031	0,0083	0,0002
<b>Verde-Blu</b>	0,7292	0,0133	0,0036	0,0000

**Tabella n°14:** Confronto con il test di Mann-Whitney delle medie di UPG rilevate nei gruppi di ovini trattati con ossiclozanide+levamisolo a dosaggi differenti nei diversi giorni di monitoraggio (in rosso i valori significativi)

		<b>G 0</b>	<b>G 14</b>	<b>G 21</b>	<b>G 45</b>	<b>G 75</b>
<b>Gruppo A</b>	<b>Media UPG</b>	142,6	56,7	121,7	114,4	270,7
	<b>Dev. Standard</b>	118	49,3	119,3	87,5	262,5
<b>Gruppo O</b>	<b>Media UPG</b>	167	37,7	32,5	30	76
	<b>Dev. Standard</b>	133,05	74	44,8	73,6	124

**Tabella n°15:** Medie delle UPG e relative Deviazioni Standard nei vari momenti di controllo del trial relativo al trattamento con ossiclozanide+levamisolo per la paramfistomosi bovina.

<b>GRUPPO TRATTAMENTO</b>	<b>G 0-G 14</b>	<b>G 0-G 21</b>	<b>G 0-G 45</b>	<b>G 0-G 75</b>
<b>GRUPPO A</b> <b>(albendazolo)</b>	0,0456	0,6625	0,9817	0,2701
<b>GRUPPO O</b> <b>(ossiclozanide+levamisolo)</b>	0,0004	0,0006	0,0003	0,0120

**Tabella n°16:** Test di Mann-Whitney condotto per valutare le differenze delle medie di UPG nello stesso gruppo di trattamento tra il G 0 e le altre fasi di monitoraggio per valutare l'efficacia dell'albendazolo e dell'ossiclozanide+levamisolo nella paramfistomosi bovina (in rosso i valori significativi).

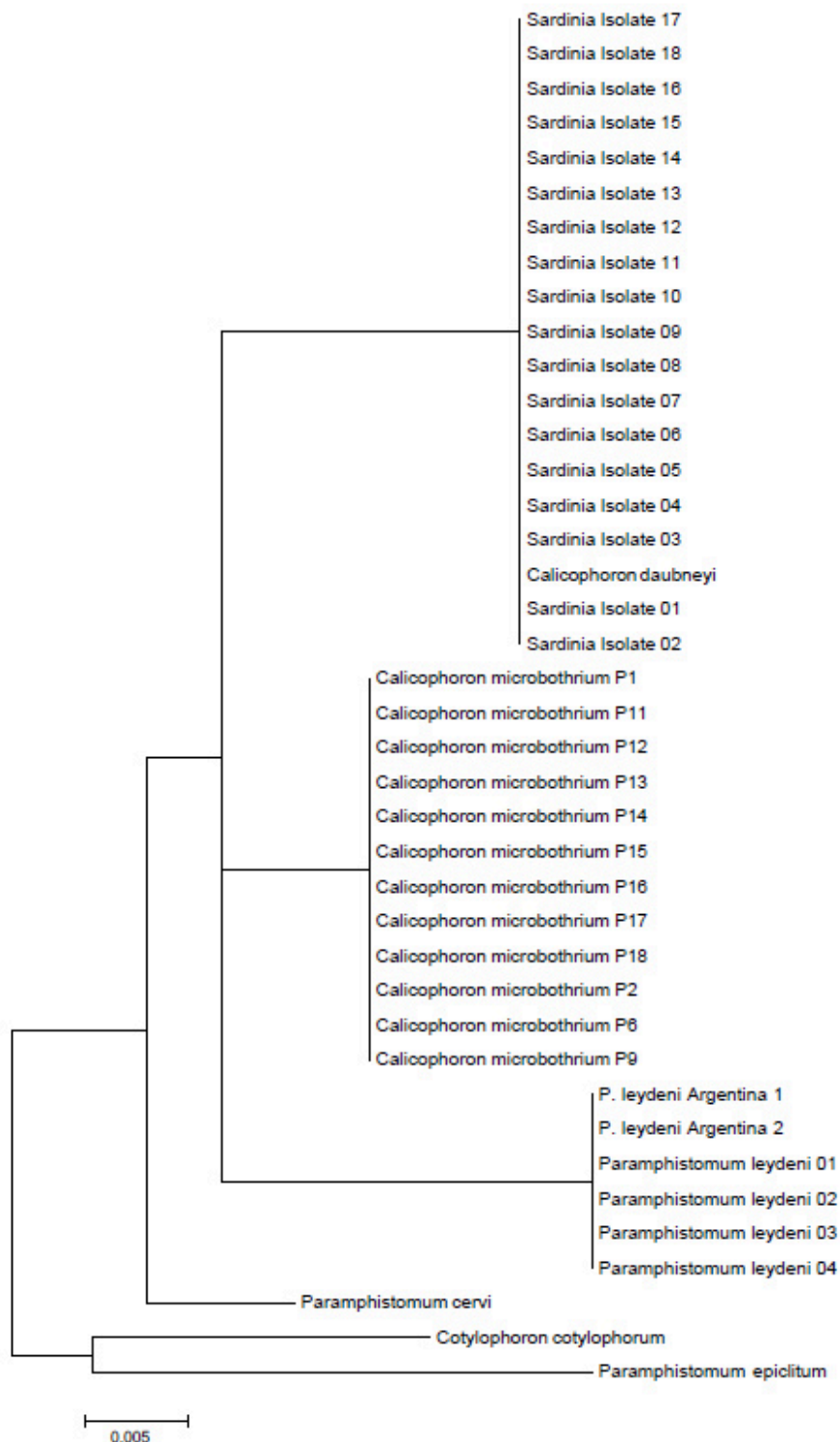
	<b>G-0</b>	<b>G-14</b>	<b>G-21</b>	<b>G-45</b>	<b>G-75</b>
<b>Gruppo A/Gruppo O</b>	0,4715	0,1228	0,0372**	0,0022**	0,0371**

**Tabella n°17:** Valori di significatività al test di Mann-Whitney condotto per valutare le differenze delle medie di UPG tra i due gruppi di trattamento nelle varie fasi di monitoraggio (in rosso i valori significativi indicati con \* a favore del primo farmaco e con\*\* a favore del secondo).

	<b>G 14</b>	<b>G 21</b>	<b>G 45</b>	<b>G 75</b>
<b>Gruppo A</b>	60,2%	14,6%	19,8%	0%
<b>Gruppo O</b>	77,4%	80,5%	82%	54,5%

**Tabella n°18:** % di efficacia dei due farmaci nei differenti momenti del monitoraggio copromicroscopico.

## 11. FIGURE



**Fig n°1:** albero filogenetico realizzato con il metodo Maximum Likelihood di Tamura-Nei (1993) considerando il gene ITS2+ per gli isolati sardi, diverse sequenze di paramfistomidi depositate in GenBank e quelli argentini identificati come *Paramphistomum leydeni*.



## 12. DOCUMENTAZIONE FOTOGRAFICA



**Foto n°1:** esemplare adulto di *Dicrocoelium Dendriticum*.



**Foto n°2:** uovo di *Dicrocoelium Dendriticum*.



**Foto n°3:** ospite intermedio di *Dicrocoelium dendriticum*, *Cochlicella acuta*.



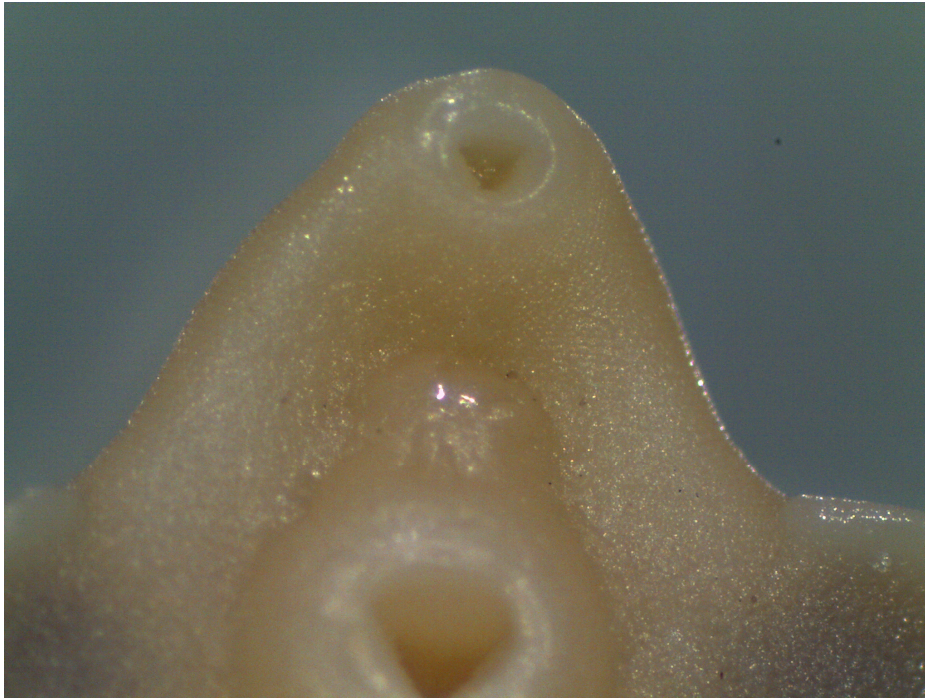
**Foto n°4:** terreni calcarei, habitat ideale per lo sviluppo degli ospiti intermedi di *Dicrocoelium dendriticum*.



**Foto n°5:** habitat ideale per i molluschi ospiti intermedi di *Fasciola hepatica*.



**Foto n°6:** esemplare adulto di *Fasciola hepatica*.



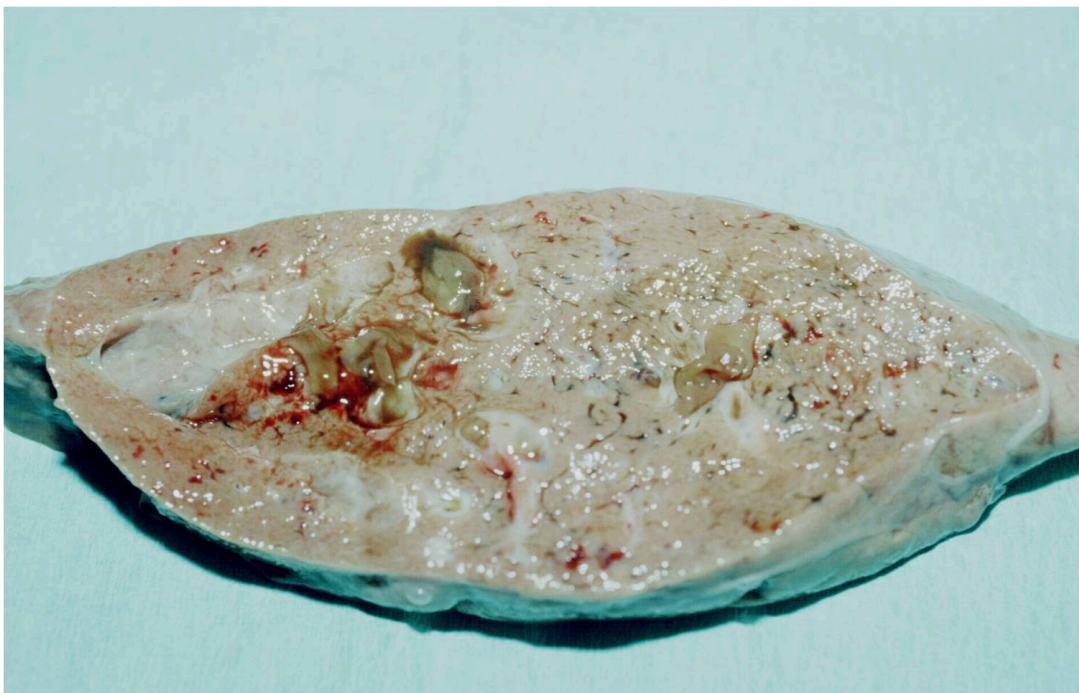
**Foto n°7:** particolare dell'estremità anteriore di *Fasciola hepatica* in cui si intravedono le spinule della cuticola.



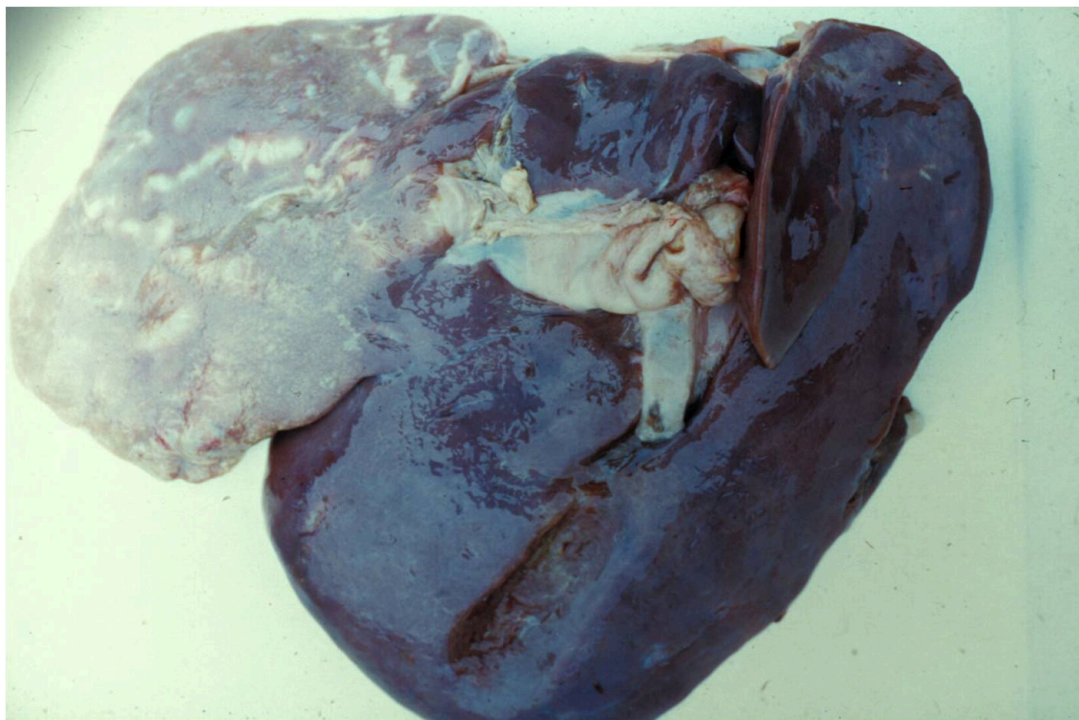
**Foto n°8:** uovo di *Fasciola hepatica*.



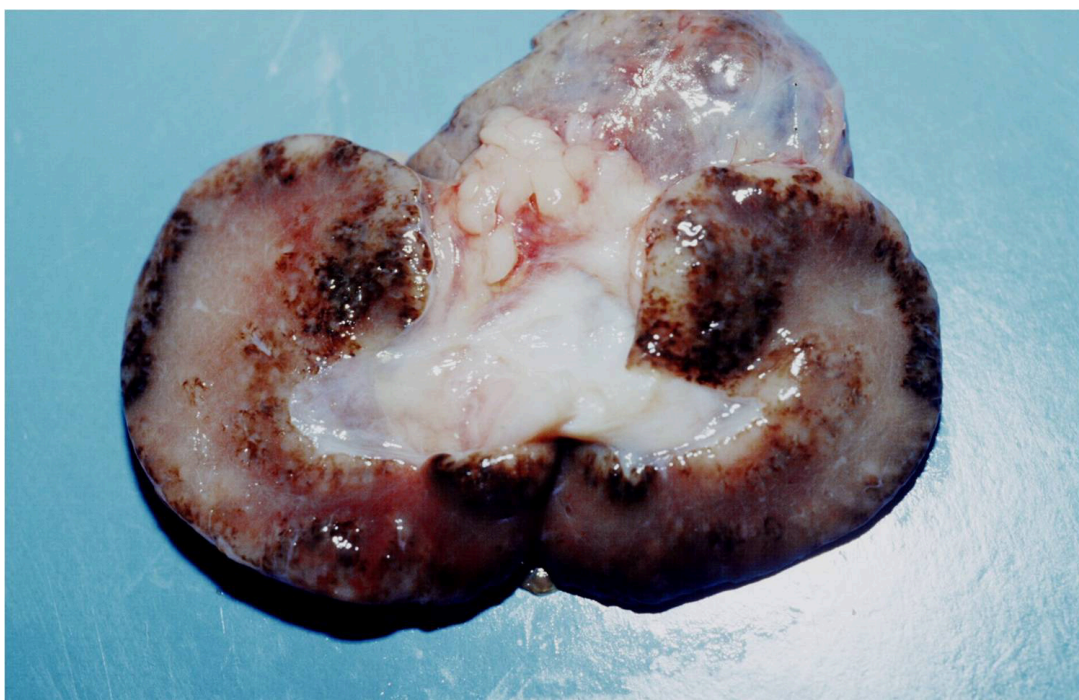
**Foto n°9:** lesioni epatiche in ovino con fasciolosi acuta da *Fasciola hepatica*.



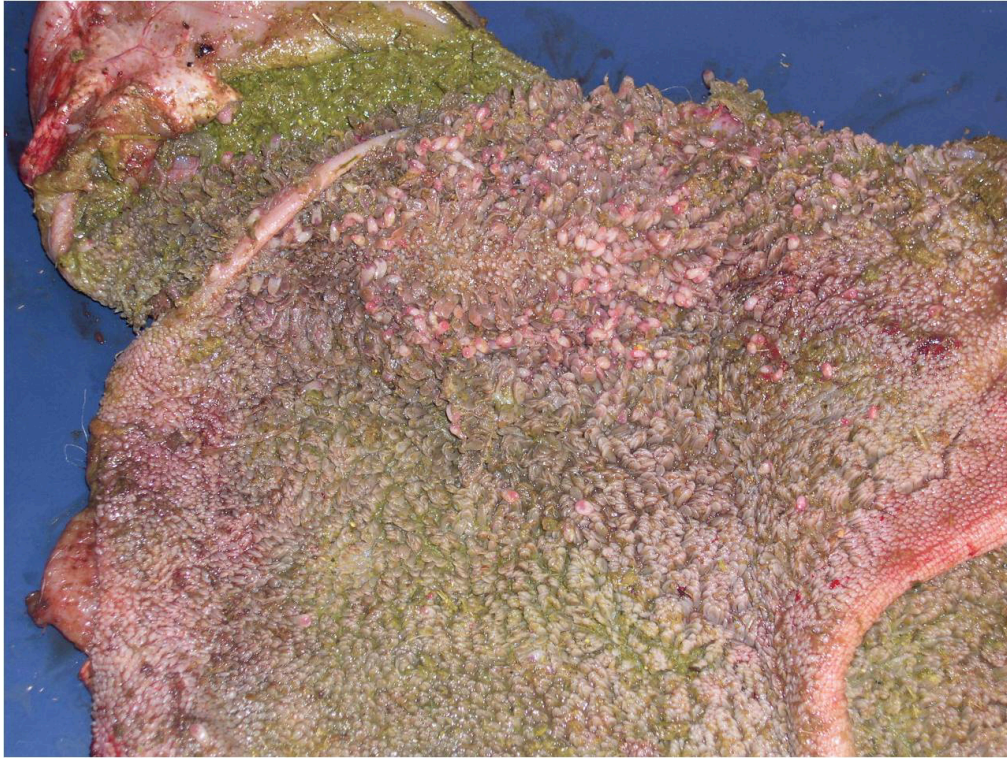
**Foto n°10:** sezione trasversa di un fegato di ovino con fasciolosi acuta/subacuta.



**Foto n°11:** fegato bovino con lesioni da *Fasciola hepatica* a carico soprattutto del lobo sinistro.



**Foto n°12:** linfonodo con pigmenti ferro-porfirina in infestazione subacuta da *Fasciola hepatica*.



**Foto n°13:** paramfistomidi nel rumine e reticolo.



**Foto n°14:** paramfistomide adulto.



**Foto n°15:** paramphistomide adulto esaminato allo stereomicroscopio previa colorazione.

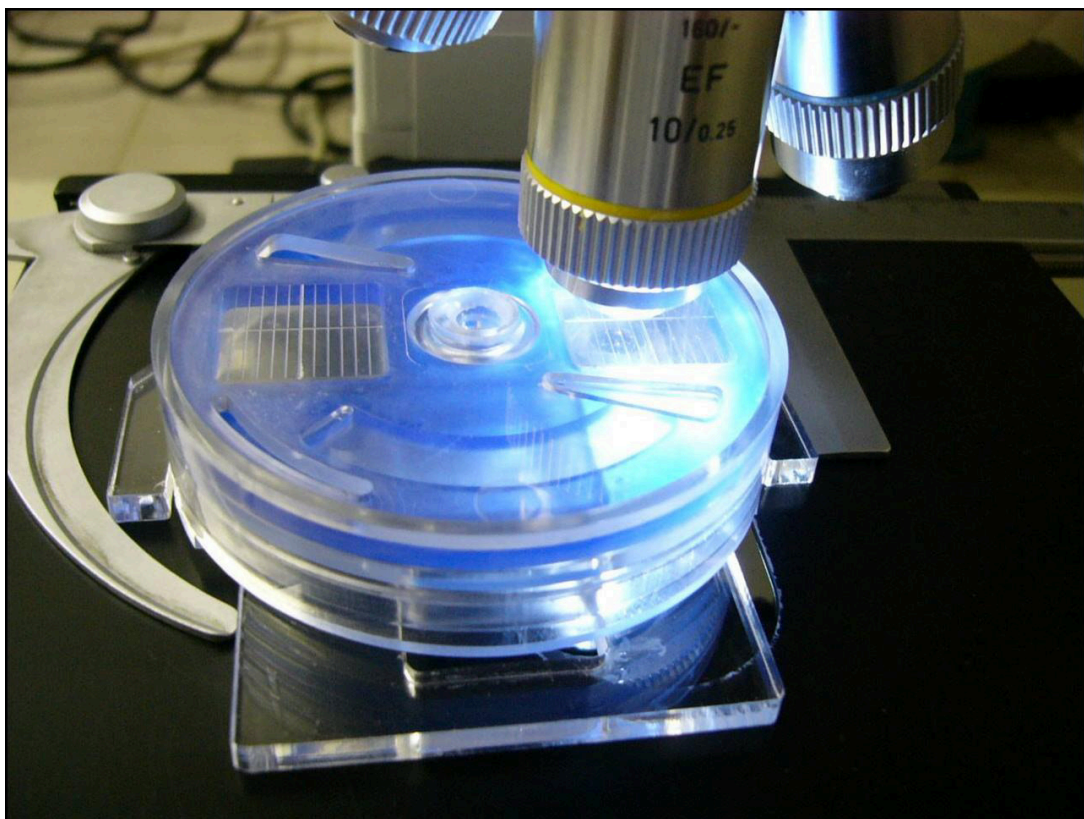


**Foto n°16:** uovo di paramphistomide.





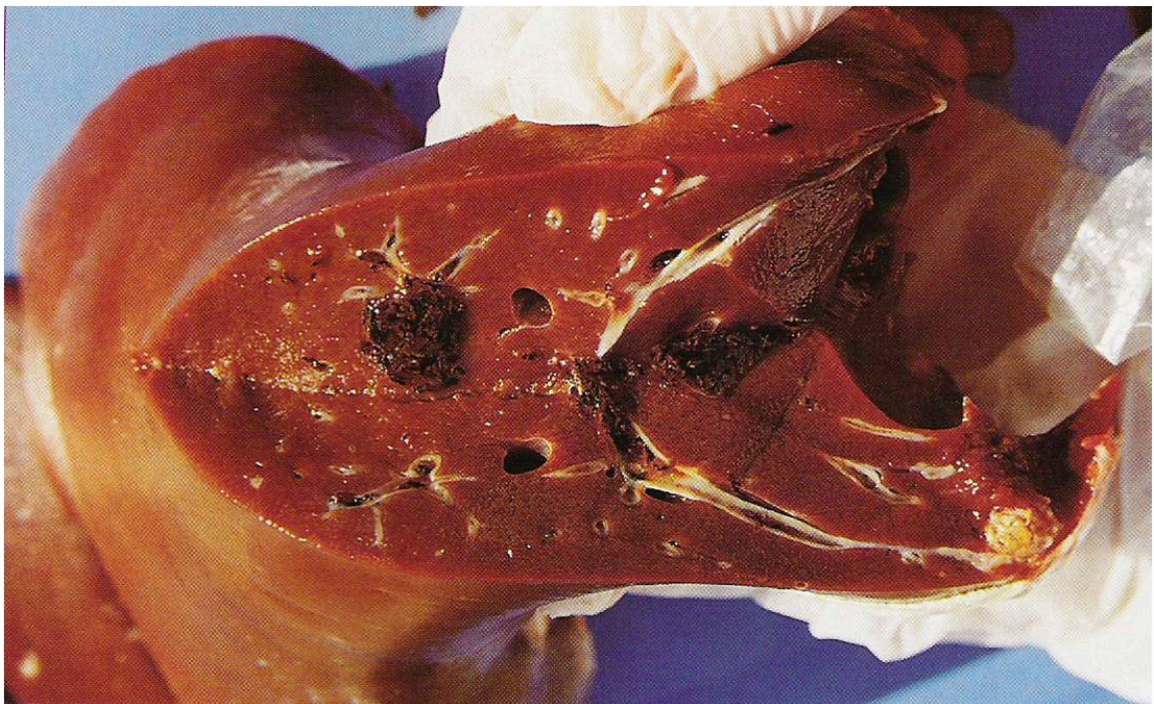
**Foto n°17:** metacercarie di paramfistomidi adese ad un vegetale.



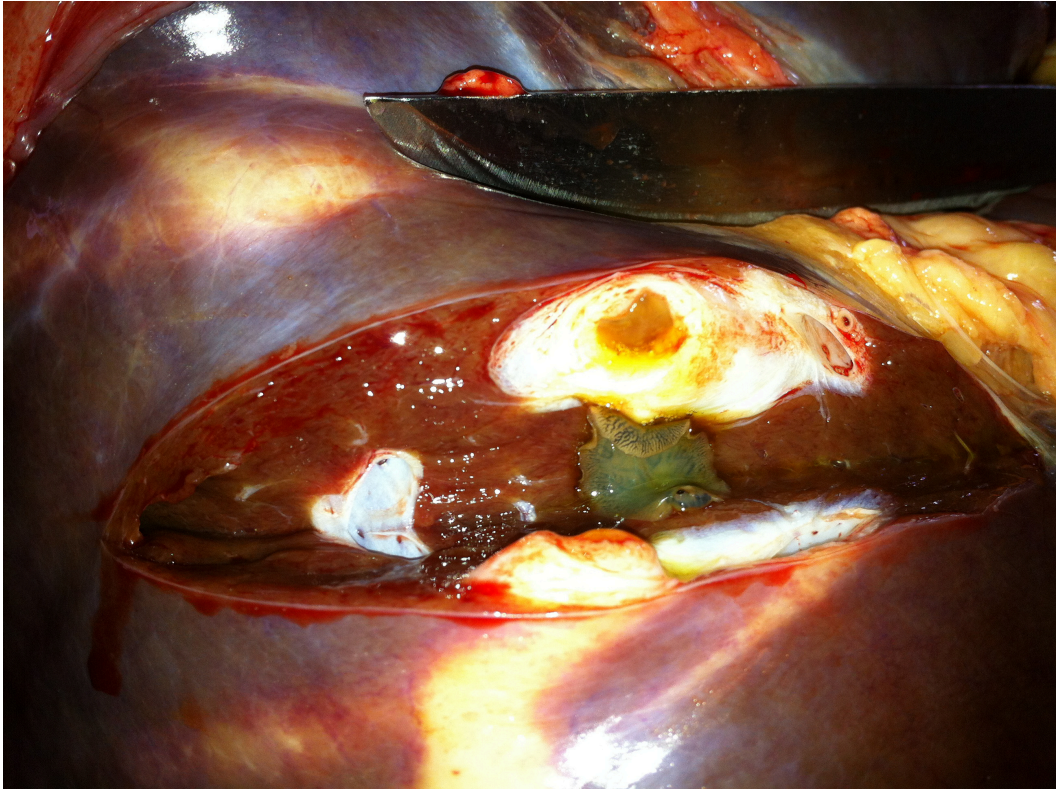
**Foto n°18:** Flotac®.



**Foto n°19:** allevamento di bovini allo stato brado/semibrado.



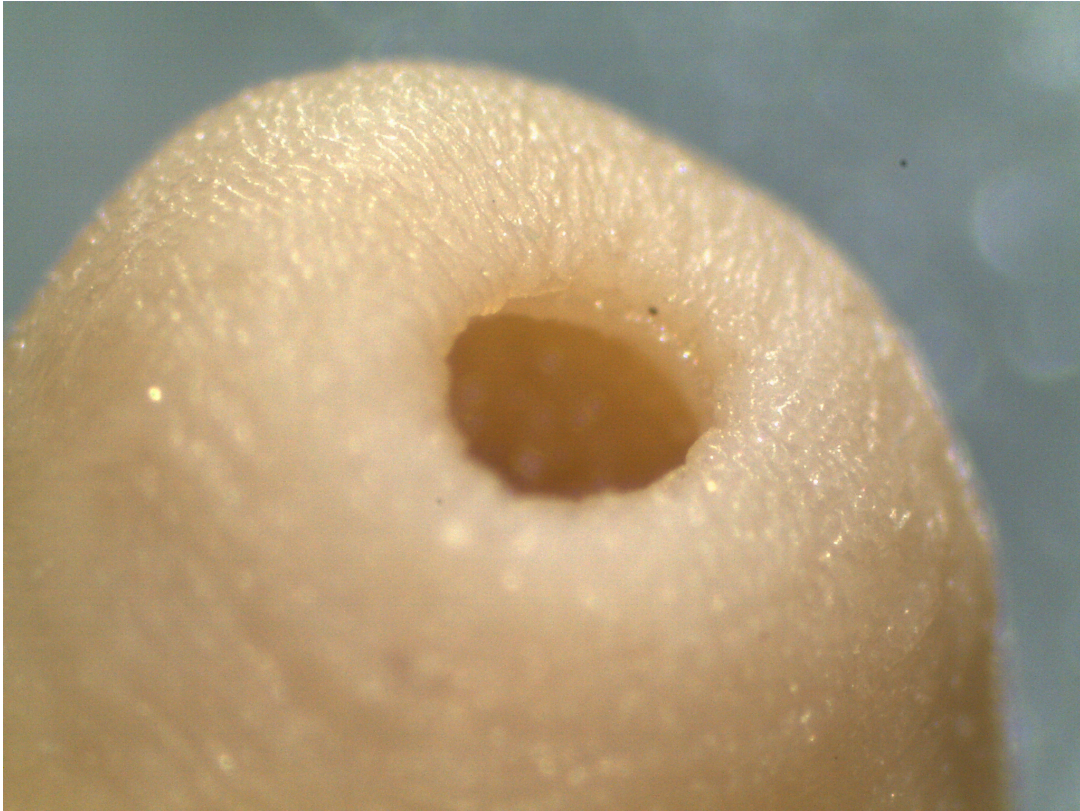
**Foto n°20:** ispessimento dei dotti biliari da *Dicrocoelium dendriticum* nell'ovino.



**Foto n°21:** ispessimento dei dotti biliari in un fegato di bovino con *Fasciola hepatica*.



**Foto n°22:** lesioni a poppatoio da paramfistomidi nel rumine.



**Foto n°23:** acetabulo di *C. daubneyi*.



**Foto n°24:** acetabulo di *Paramphistomum leydeni*.