



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

Corso di laurea magistrale a ciclo unico in
MEDICINA VETERINARIA

Indagine sul rischio di antielmintico resistenza in allevamenti caprini dell'Italia nord-orientale

Relatore

Prof. Rudi Cassini

Correlatore

Dott.ssa Anna Maurizio

Laureando

Paolo Dossi

Matricola n.

1178564

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

SOMMARIO

RIASSUNTO.....	1
ABSTRACT.....	3
INTRODUZIONE.....	5
1. L'allevamento caprino.....	5
1.1. L'allevamento nei Paesi in via di sviluppo.....	7
1.2. L'allevamento nei Paesi sviluppati.....	8
2. Endoparassitosi.....	9
2.1. Diagnosi delle endoparassitosi.....	18
2.2. Gestione delle endoparassitosi.....	23
3. Antelmintico resistenza.....	26
3.1. Diagnosi di antelmintico resistenza.....	31
3.2. Strategie per il controllo dell'antelmintico resistenza.....	34
PARTE SPERIMENTALE.....	39
4. Obiettivi dello studio.....	39
5. Materiali e metodi.....	40
5.1. Area di studio.....	40
5.2. Campionamento.....	41
5.3. Analisi di laboratorio individuali.....	43
5.4. Analisi di laboratorio su pool.....	44
5.5. Calcolo della FECR% e interpretazione del dato.....	46
6. Risultati.....	47
6.1. Monitoraggio aziendale.....	47
6.2. Efficacia trattamento.....	50
DISCUSSIONE.....	55
BIBLIOGRAFIA.....	63
SITOGRAFIA.....	69
ALLEGATI.....	71
RINGRAZIAMENTI.....	75

RIASSUNTO

Le endoparassitosi costituiscono l'80% delle patologie osservate nella capra, rappresentando il principale limite alla produzione per questa specie, oltre che un costo che viene stimato pesare per 2,5 milioni di euro all'anno sulle tasche degli allevatori italiani. Le strongilosi gastrointestinali (SGI) sono in assoluto le malattie parassitarie più rilevanti.

Il principale approccio alla gestione degli SGI negli ultimi 50 anni è stato quello farmacologico. Eccessiva frequenza di trattamento, mancata rotazione delle molecole, trattamenti a tappeto e sottodosaggio sono alcuni degli errori che portano allo sviluppo di resistenza, ovvero la capacità ereditabile di un parassita di sopravvivere a un trattamento antielmintico.

Sono state sviluppate diverse metodiche per diagnosticare un calo di efficacia del trattamento; le più affidabili richiedono un certo impegno economico e di tempo, rendendole poco utilizzate da allevatori e medici veterinari.

Per un approccio sostenibile alle endoparassitosi è indispensabile adottare una gestione integrata alla problematica associando il trattamento farmacologico a pratiche di stimolazione immunitaria, all'adozione di corrette pratiche ambientali e di management del gregge.

Sono stati introdotti i concetti di trattamento selettivo (TT) e trattamento selettivo individuale (TST); il primo consiste nel selezionare il momento migliore, il secondo nel selezionare i singoli individui da trattare per preservare una quota di parassiti suscettibili alla molecola. Anche queste pratiche, seppur riconosciute come efficaci nel ritardare l'insorgenza di resistenza, sono poco diffuse a causa dell'impegno che richiedono.

Con questa indagine è stata valutata l'efficacia del trattamento antielmintico in 6 aziende dell'Italia nord-orientale, utilizzando un protocollo di FECRT (Fecal Egg Count Reduction Test). Inoltre, in seguito a coprocoltura, sono state identificate le larve schiuse per valutare la prevalenza relativa dei diversi generi di SGI pre e post trattamento.

Delle 6 aziende valutate, in 2 il trattamento è risultato avere scarsa efficacia e in un'altra l'efficacia è risultata dubbia. *Haemonchus* è stato il genere che ha mostrato la minor riduzione nella FEC (Fecal Egg Count) post trattamento.

Nei decenni scorsi in Italia la prevalenza di resistenza era molto più bassa della media europea, probabilmente grazie anche alla minor frequenza di trattamento tipica del nostro Paese. Tuttavia, come anche questo studio dimostra, non sono più sufficienti le pratiche usate finora per contenere la diffusione dell'antelmintico resistenza. Risulta necessario un maggiore ricorso al monitoraggio del carico parassitario, l'adozione di pratiche sostenibili di controllo degli SGI e la conduzione di test di efficacia del trattamento in caso di sospetta resistenza in allevamento.

ABSTRACT

Endoparasitic infestations account for 80% of all the pathologies observed in goats, representing the main limit to production for this species, as well as a bill that is estimated around 2.5 million euros per year to be paid by Italian farmers.

Gastrointestinal strongylosis (GIS) are by far the most relevant parasitic diseases.

The main way to cope with GISs in the last 50 years has been based on the pharmacological approach. Excessive frequency of treatment, lack of molecule rotation, blanket treatments and underdosing are some of the errors that lead to the development of resistance, that is the heritable ability of a parasite to survive an anthelmintic treatment.

Several methods have been developed to diagnose a decline in treatment efficacy; the most reliable ones require a certain amount of money and time, making them rarely used by breeders and veterinarians.

It is essential to adopt an integrated management of the problem for a sustainable approach to endoparasitosis associating pharmacological treatment with immune stimulation practices, adoption of correct environmental and herd management practices.

The concepts of targeted treatment (TT) and targeted selective treatment (TST) were introduced; the first consists in selecting the best time, the second in selecting the single individuals to be treated in order to preserve a quota of parasites susceptible to the molecule. These practices, although recognized as effective in delaying the onset of resistance, are not very widespread due to the commitment they require.

With this survey it was possible to evaluate the effectiveness of an anthelmintic treatment in 6 farms in north-eastern Italy, using a FECRT (Fecal Egg Count Reduction Test) protocol. Furthermore, following coproculture, hatched larvae were identified to assess the relative prevalence of the different GIS genera before and after treatment.

Of the 6 farms evaluated, in 2 of them the treatment was found to have reduced effectiveness and in another one the effectiveness was doubtful. *Haemonchus* was the genus that showed the least reduction in post-treatment FEC (Fecal Egg Count).

In the last decades in Italy the prevalence of resistance was much lower than the European average, probably thanks also to the lower frequency of treatment, typical of this country. However, as this study also demonstrates, the practices used so far are no longer sufficient to contain the spread of anthelmintic resistance. There is a need for greater use of parasitic burden monitoring, the adoption of sustainable GIS control practices and the implementation of treatment efficacy tests in the event of suspected resistance on the farm.

INTRODUZIONE

1. L'ALLEVAMENTO CAPRINO

La popolazione caprina a livello mondiale è in continua crescita ed è arrivata a superare il miliardo di capi; in particolare il numero di animali di questa specie domestica è aumentato del 91% dal 1990. Tale incremento è significativo come si può evincere dal *grafico 1*, soprattutto se rapportato alle altre realtà zootecniche; nello stesso periodo l'aumento di individui è stato soltanto del 17% per i bovini, 12% per i suini e del 4% per gli ovini; solo il numero di polli ha subito un incremento maggiore (+211%) (FAOSTAT, 2020).

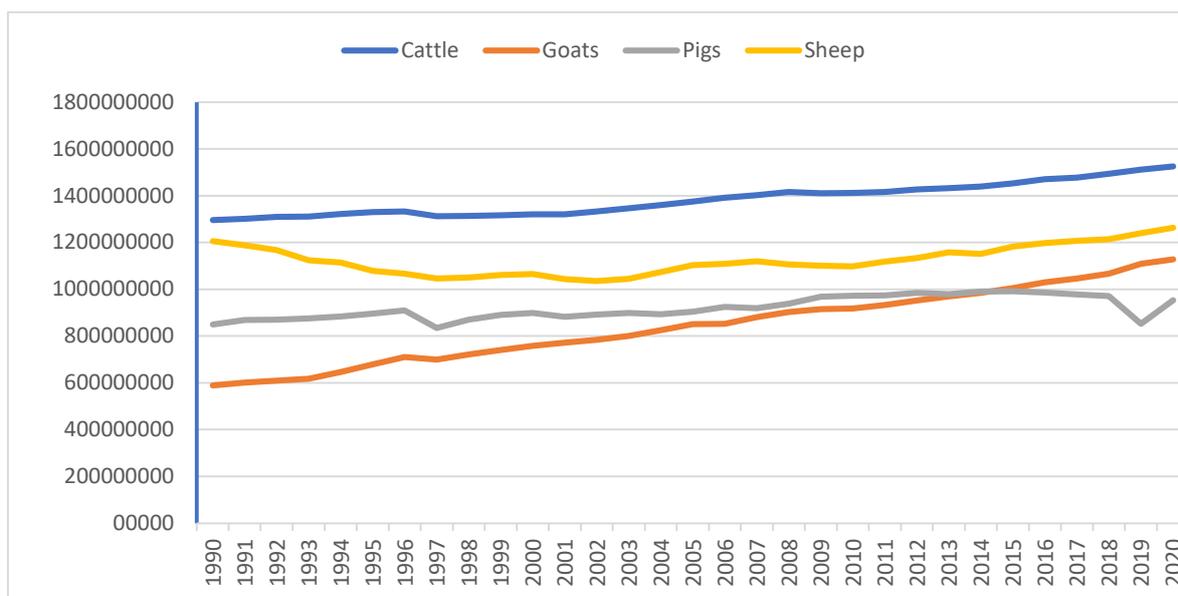


Grafico 1: andamento della consistenza stimata di capi per specie a livello mondiale dal 1990 al 2020 (FAOSTAT, 2020).

Anche le produzioni principali derivanti dall'allevamento caprino, ovvero latte e carne, seguono dagli anni '80 un trend di continuo incremento come mostrato nei *grafici 2 e 3* (FAOSTAT, 2022).

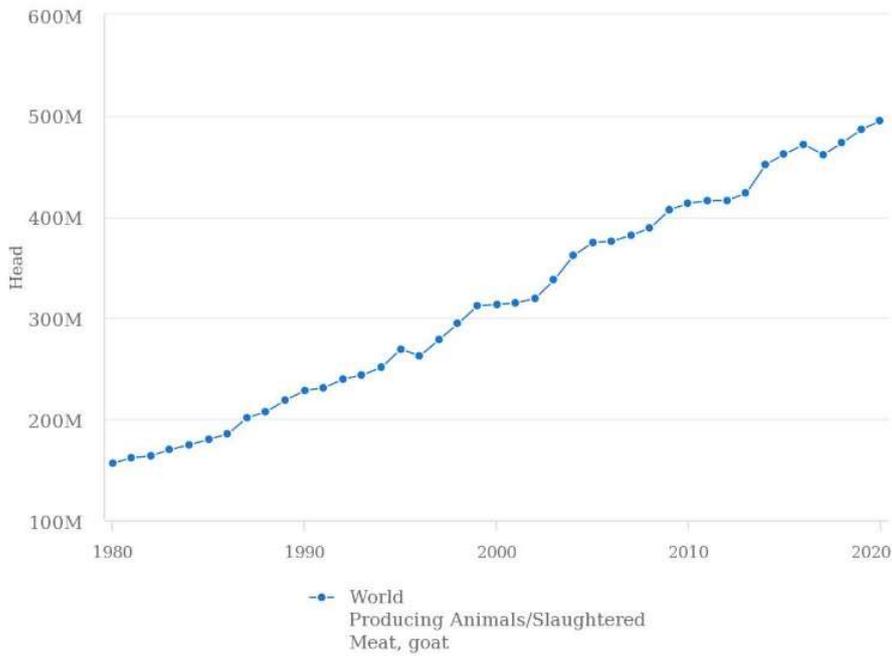


Grafico 2: andamento produzione latte di capra a livello mondiale (FAOSTAT, 2022)

Source: FAOSTAT (Mar 17, 2022)

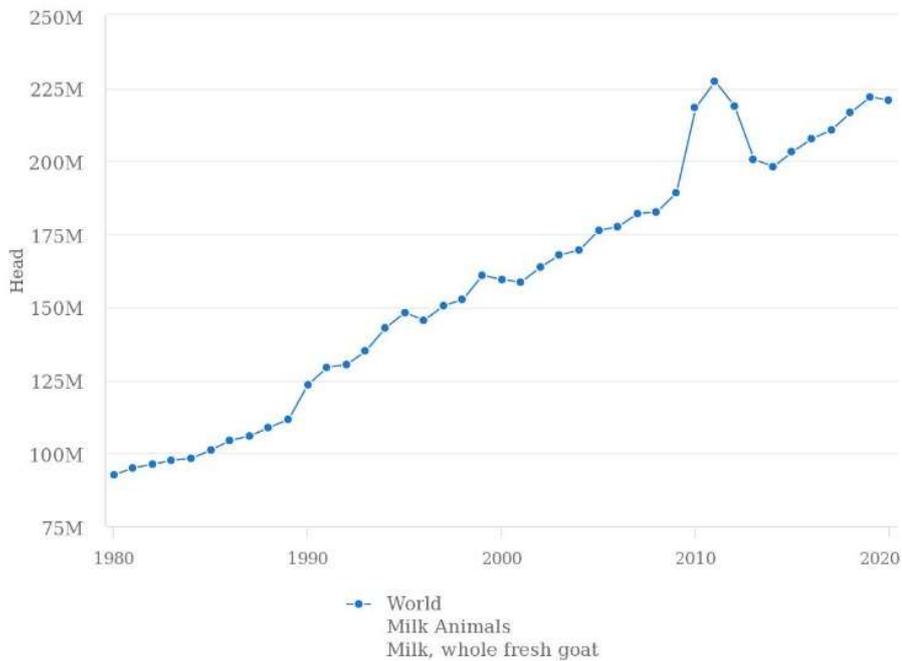


Grafico 3: andamento produzione carne di capra a livello mondiale (FAOSTAT, 2022)

Source: FAOSTAT (Mar 17, 2022)

1.1 L'allevamento nei paesi in via di sviluppo

La presenza di oltre il 90% della popolazione caprina in Asia e Africa sottolinea come l'appellativo "vacca dei poveri", che viene attribuito a questa specie, sia rappresentativo della sua importanza nei piccoli sistemi di allevamento presenti nei Paesi in via di sviluppo. Infatti, l'autoconsumo di prodotti derivanti dall'allevamento di questi animali è spesso l'unica fonte di proteine per gli abitanti delle zone più povere del pianeta.

L'incremento della consistenza caprina, soprattutto in questi Paesi, è attribuibile all'economicità sia dell'acquisto che del mantenimento di questi animali, al loro peso e dimensioni ridotte che ne consentono una facile manipolazione e movimentazione e alla capacità di adattamento di alcune razze di questa specie a climi aridi e semi-aridi. Questa abilità ha conferito loro un enorme potenziale di conversione di foraggi e alimenti di scarsa qualità in prodotti con alto valore nutrizionale per l'uomo come latte e carne (Hoste et al., 2010; Silanikove, 2000). Inoltre, con l'aumento dei periodi di siccità a causa dei cambiamenti climatici, i pastori africani tendono sempre più ad aumentare la proporzione di capre nelle loro mandrie a discapito delle vacche grazie alla loro maggiore resistenza a climi estremi, alla riproduzione più veloce e al più immediato ripristino del numero di capi dopo delle perdite dovute agli eventi climatici estremi (Miller & Lu, 2019; Morand-Fehr et al., 2004; Peacock & Sherman, 2010).

L'allevamento e la gestione di capre in queste aree promuove anche l'uguaglianza di genere, dal momento che spesso sono le donne ad occuparsi degli animali e più i prodotti derivanti da questa attività diventano redditizi, più aumenta il potere decisionale delle donne nella popolazione (Miller & Lu, 2019).

1.2 L'allevamento nei paesi sviluppati

L'allevamento caprino, seppur marginale rispetto a quello di altre specie, ricopre un ruolo con un'importanza via via più significativa anche nei Paesi economicamente sviluppati. I prodotti di origine caprina, infatti, coprono una nicchia di mercato che dimostra una domanda costantemente in crescita (Peacock & Sherman, 2010). I motivi di questa crescita sono vari: vengono percepiti e apprezzati come “artigianali”, evocano nei consumatori del Nord Europa le sensazioni delle vacanze trascorse nel Mediterraneo e infine, dal punto di vista nutrizionale, il formaggio fresco di capra e la carne di capretto sono considerati più leggeri e adatti a una dieta con meno grassi (Morand-Fehr et al., 2004).

Nei Paesi Europei, e l'Italia non fa eccezione, la capra viene allevata per ottenere latte mentre la produzione di carne è un prodotto secondario; la quasi totalità del latte in queste aree viene destinato all'industria casearia per essere trasformato in formaggi (Sandrucci et al., 2019).

L'Italia è in linea con il trend crescente in quanto a consistenza di capi caprini, raggiungendo più di 1 milione di unità registrate nel 2021 (ANZ, 2021). All'interno del nostro Paese però si notano delle differenze marcate in quanto a numero medio di capi per allevamento tra Nord, in cui sono presenti molti piccoli allevamenti di pochi capi, e Centro-Sud in cui sono presenti in proporzione meno allevamenti con un numero medio di capi maggiore (ANZ, 2021).

In Italia, come negli altri Paesi del bacino del Mediterraneo (Francia, Spagna, Grecia), troviamo un tipo di allevamento storico e tuttora radicato, in cui viene sfruttata la rusticità della capra per condurre l'attività in territori poco ospitali a specie più esigenti e non sfruttabili per coltivazioni agricole redditizie (Escareño et al., 2012). Si prestano a questo tipo di management tutto l'arco alpino e il sud Italia con le isole (Sardegna in particolare). Si tratta di allevamento estensivo con sfruttamento del pascolo, spesso si fanno rientrare gli animali in stalla durante la sera e possono essere forniti dei mangimi, ma l'alimentazione è basata sul foraggio fresco. Questo tipo di gestione degli animali permette al contempo la manutenzione ambientale dei territori in cui si svolge l'attività di allevamento, che si traduce in contenimento del rischio idrogeologico, pulizia dei boschi e riduzione del rischio di incendi (Battaglini, 2007.),

risultando la più importante attività di gestione delle aree marginali montane (Paoletti & Aceto, 2007).

Parallelamente si sono sviluppate delle realtà allevatorie di tipo intensivo o semi-intensivo in cui gli animali sono tenuti in stalla e a volte hanno a disposizione un pascolo. In questo tipo di allevamento la selezione genetica, la nutrizione, le tecniche riproduttive avanzate, la tecnologia e il management hanno permesso di raggiungere produzioni latte molto elevate (Miller & Lu, 2019); basti pensare che in Europa sono presenti il 2,5% dei greggi di capre ma viene prodotto il 18% del latte di capra mondiale. Bisogna però anche tenere presente che la produzione latte nei paesi in via di sviluppo è sottostimata a causa della grande porzione destinata all'autoconsumo. (Escareño et al., 2012)

I sistemi di allevamento per le capre sono quindi caratterizzati in Italia da grande variabilità: dalla gestione intensiva in stalla, alla semi-estensiva ed estensiva all'aperto, con razze locali o razze ad elevata produttività (Sandrucci et al., 2019)

Ponendo il focus sull'Italia nord-orientale, area in cui è stata svolta la parte sperimentale di questo progetto, risulta evidente la predilezione dell'allevamento caprino in zone montane, che raccolgono il 60% degli allevamenti caprini totali e il 70% dei capi totali (Paoletti & Aceto, 2007).

2. ENDOPARASSITOSI

Le parassitosi nella capra e nella pecora sono ritenute essere responsabili dell'80% di tutte le patologie osservate in queste specie (Torina et al., 2004) rappresentando uno dei limiti principali nell'allevamento per la produzione di latte. Le malattie parassitarie più importanti in quanto a diffusione e impatto sull'allevamento sono la gastroenterite da nematodi e la coccidiosi da *Eimeria spp.* (M. Taylor, 2002). La prima, soprattutto, è di gran lunga la più importante a livello economico (M. Taylor, 2002).

La specie caprina è considerata come la più suscettibile tra i ruminanti domestici alle parassitosi da elminti, caratterizzate da elevate cariche parassitarie ed ingente eliminazione di uova nelle feci (Fthenakis & Papadopoulos, 2018). Per molto tempo le capre sono state considerate fondamentalmente uguali alle pecore e ciò ha portato a una carenza di esperienza diretta sulla specie caprina e alla compromissione dei programmi di controllo dovuta anche alla mancanza di discriminazione tra i due ospiti nella posologia riportata su foglietto illustrativo degli antielmintici (Hoste et al., 2010).

Nei Paesi in via di sviluppo le maggiori conseguenze delle infestazioni parassitarie sono tassi di mortalità anche elevati, soprattutto nei capretti, mentre in aree del mondo più ricche la conseguenza più rilevante è la perdita produttiva (Hoste et al., 2010), nonostante le endoparassitosi siano una causa di morte principale in capretti e adulti anche in Paesi come gli Stati Uniti (Zajac & Garza, 2020). La minor produttività è rappresentata da minore ingestione di alimento, ridotto accrescimento, aumento del tasso di mortalità, diminuzione del peso e alterata composizione della carcassa, ridotta crescita del pelo, riduzione della fertilità e della produzione lattea (Charlier et al., 2020) anche del 20% (Lambertz et al., 2018).

È stata recentemente messa in luce la rilevanza economica delle parassitosi in alcuni Stati Europei: solamente per quanto riguarda le infestazioni da elminti, quindi principalmente strongilosi gastrointestinali, ed esclusivamente nel settore della capra da latte, ogni anno il costo che gli allevatori italiani pagano è di oltre 2,5 milioni di euro. Di questa cifra circa l'80% è attribuibile alle spese per i trattamenti farmacologici e il 20% alle perdite produttive. Rapportato al singolo capo, la spesa media annuale per il controllo delle elmintiasi per una capra da latte, in Italia, è di 25€ (Charlier et al., 2020). Questo dato, per di più, non tiene in considerazione né la coccidiosi, seconda parassitosi per importanza, né le altre malattie parassitarie.

Sempre parlando di costi, è illustrato nel *grafico 4* come nei Paesi del bacino del Mediterraneo (MED), Italia compresa, i costi nel settore dell'allevamento caprino abbiano una rilevanza maggiore degli altri settori in proporzione rispetto al resto delle aree europee (Charlier et al., 2020).

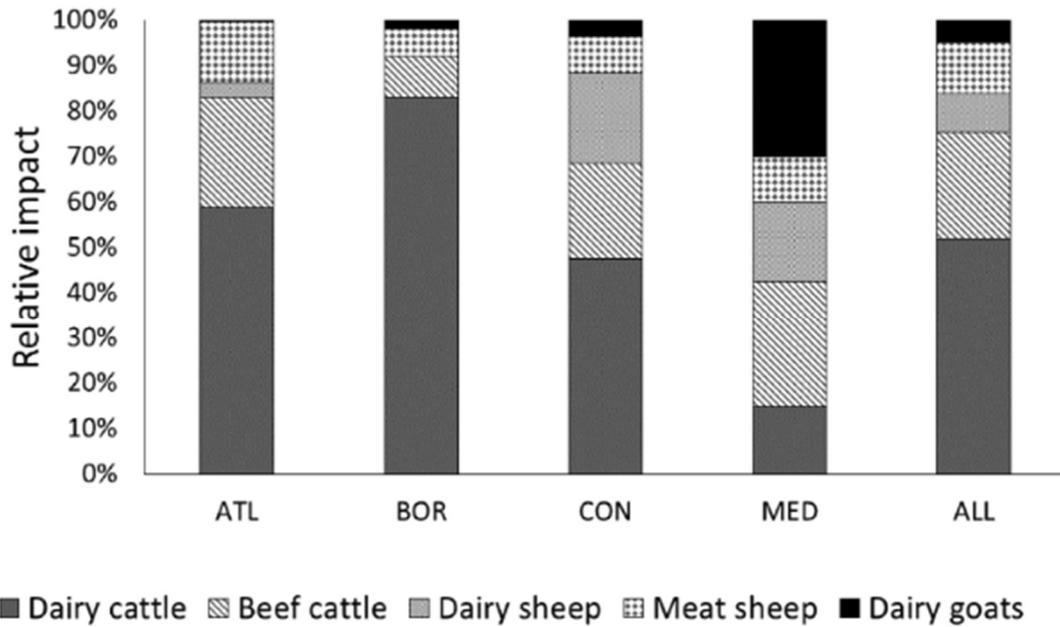


Grafico 4: impatto economico relativo delle parassitosi in vari settori dell'allevamento riferito a diverse aree geografiche. ATL = Atlantico (BE, FR, UK, IE, NL), BOR = Boreale (NO, SE), CON = Continentale (AT, DE, LT, MK, PL, RO), MED = Mediterraneo (ES, IL, IT, PT, TU), ALL = combinazione di tutti i Paesi. Tratto da Charlier et al. (2020).

Le parassitosi gastrointestinali nella specie caprina possono essere sostenute da protozoi ed elminti. In *figura 1* si possono apprezzare le principali specie con i relativi generi e famiglie di appartenenza.

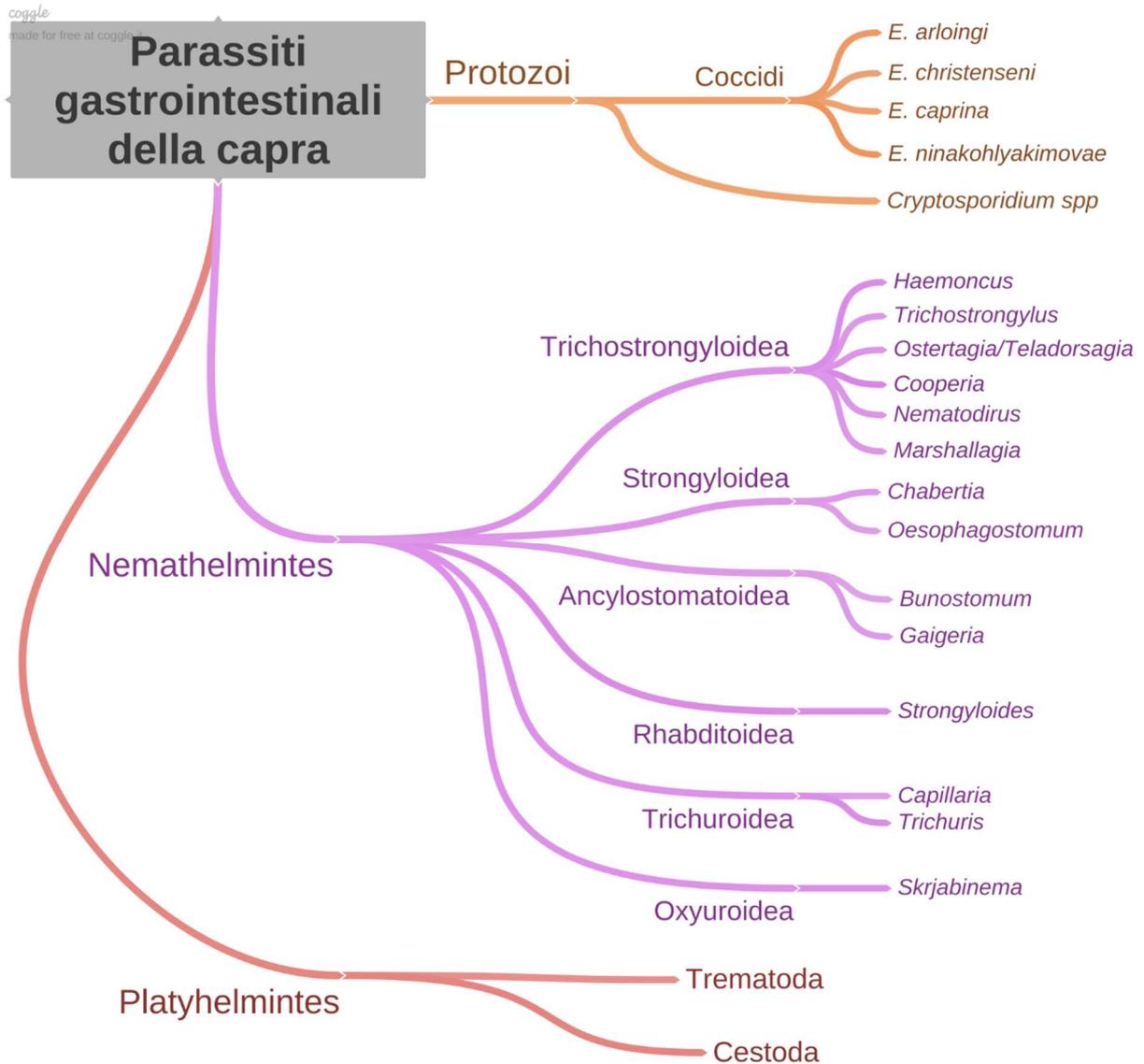


Figura 1: principali parassiti gastro-intestinali della capra, divisi per classi, famiglie e generi, secondo la classificazione di Taylor et al. (2015).

I coccidi sono organismi unicellulari e parassiti intracellulari; hanno un ciclo vitale che si può dividere in una parte ambientale e una nell'ospite. L'ospite si infetta ingerendo l'oocisti sporulata che penetra negli enterociti e si riproduce in maniera asessuata producendo oocisti immature che vengono espulse attraverso le feci nell'ambiente, dove maturano allo stadio infettante. L'infezione da coccidi è auto-

limitante in quanto, se l'animale infettato non ingerisce altre oocisti, si libera del parassita attraverso le feci.

Le coccidiosi da *Eimeria spp.* sono le malattie parassitarie più rilevanti nell'allevamento caprino dopo le strongilosi gastrointestinali, con manifestazioni cliniche e subcliniche che si traducono in grosse perdite, stimate per 140 milioni di dollari all'anno a livello mondiale per quanto riguarda il settore ovicaprino (Bangoura & Bardsley, 2020). I soggetti più critici per questa infezione sono i capretti, più suscettibili all'insorgenza clinica della patologia e i maggiori eliminatori di oocisti nell'ambiente.

I sintomi clinici principali nella capra sono: diarrea profusa, solitamente non emorragica ma a volte mucosa, con conseguente disidratazione e perdita di peso, e rilevanti percentuali di mortalità improvvisa (Chartier & Paraud, 2012). Chartier ha individuato la coccidiosi come una delle due principali cause di morte, insieme a patologie respiratorie, nei capretti svezzati. Capre in salute sono in genere immuni alla malattia clinica da un anno di età ma fungono da serbatoio per i soggetti più giovani; infatti, i capretti sono suscettibili da 1 a 6 mesi di età con un picco di insorgenza clinica di malattia tra le 4 e le 8 settimane (Tammy et al., 2018). Uno dei maggiori problemi nel controllo della coccidiosi caprina è la convivenza di capretti neonati con individui già infestati, mettendo a serio rischio i primi che sono più fragili (Taylor et al., 2015). Altro fattore di rischio importante è la densità di capi in allevamento che determina un aumento esponenziale della contaminazione dell'ambiente con oocisti. Tra le conseguenze subcliniche si riscontra ridotto accrescimento e anche conseguenze a lungo termine quali una produzione lattea minore nella carriera della capra (Chartier & Paraud, 2012).

E. ninakohlyakimovae ed *E. caprina* sono le due specie più patogene che causano diarrea anche emorragica, a causa dell'erosione della mucosa del grosso intestino; *E. arloingi* può causare diarrea acquosa con formazione di polipi e iperplasia focale della mucosa (Bangoura & Bardsley, 2020; Taylor et al., 2015)

I coccidi sono molto prolifici: ogni oociste sporulata ha un potenziale riproduttivo di 23 milioni di oocisti durante la fase endogena in soli 21 giorni, determinando ingente contaminazione ambientale proporzionale alla densità di capi infestati (Tammy et al., 2018). Per questo motivo le coccidiosi sono da considerarsi

patologie di allevamento piuttosto che individuali. Da alcuni studi sono emerse prevalenze di infezione da coccidi anche del 98% in allevamenti caprini inglesi (Bangoura & Bardsley, 2020), ma questo tipo di situazione è classica anche degli allevamenti italiani dove l'infezione della quasi totalità del gruppo è la norma.

Per questi motivi il focus del controllo sulle coccidiosi nei ruminanti, come sulle altre parassitosi gastrointestinali, deve essere diretto ad una riduzione della pressione infettiva a livello non critici e ad una stabilità endemica, piuttosto che a tentare una – impossibile - eradicazione (Bangoura & Bardsley, 2020).

I trematodi sono vermi piatti con simmetria longitudinale, non segmentati ed ermafroditi. A seconda della famiglia di trematode, i parassiti possono albergare nel sistema gastroenterico (in particolare nel rumine, i Paramphistomidae), nei dotti biliari (Dicrocoelidae e Fasciolidae) o nei vasi ematici (Schistosomatidae). Hanno un ciclo biologico indiretto molto legato alla presenza di ristagni d'acqua, elemento fondamentale sia per la presenza degli ospiti intermedi che per la vitalità delle forme immature del parassita. L'animale si infesta ingerendo con l'erba lo stadio infestante del parassita, la metacercaria. Una volta che l'ospite definitivo ingerisce le metacercarie, queste liberano a livello intestinale i trematodi immaturi che migrano verso il sito prediletto e mutano nello stadio adulto.

I trematodi non vivono esattamente nell'apparato gastroenterico (tranne *Paramphistomum* che risiede nel rumine) ma hanno una stretta correlazione patogenetica con esso. Infatti, causando lesioni al fegato, parassiti come *Fasciola hepatica* e *Dicrocoelium dendriticum* causano anche alterazioni nel processo digestivo. La fasciolosi è una malattia legata al pascolo e in particolare alla presenza dell'ospite intermedio come descritto precedentemente nel ciclo biologico. Può essere acuta o cronica; la prima è dovuta alla migrazione delle larve all'interno del parenchima epatico, che causa necrosi epatocellulare ed emorragia di gravità direttamente proporzionale al carico infestante. Nel cronico invece viene spesso riscontrata anemia, ipoproteinemia, edema sottomandibolare ed ascite, in quanto, essendo ematofago, il parassita sottrae dai dotti biliari in cui si stabilisce fino a 0,5mL di sangue al giorno all'ospite. La fasciolosi può anche determinare epatite necrotizzante infettiva secondaria da *Clostridium novyi* a causa della migrazione

dall'intestino e dell'ambiente anaerobico che si viene a creare nel tragitto intra parenchimale. Mentre nel bovino la fasciolosi risulta autolimitante a causa dell'ispessimento fibrotico dei dotti biliari e alla conseguente impossibilità a nutrirsi del parassita, negli ovicapri c'è solo una dilatazione dei dotti che rende la fasciolosi cronica più duratura (Taylor et al., 2015; Zachary, 2016). A livello economico il danno è legato alla ridotta produttività e accrescimento, mortalità e scarto degli organi al macello.

I cestodi sono vermi piatti con simmetria bilaterale, hanno un corpo nastriforme e segmentato per la presenza delle proglottidi. Ogni segmento (proglottide) origina dal collo; inizialmente è una proglottide immatura poi, andando verso il fondo del cestode, si trovano dapprima proglottidi mature e poi proglottidi gravide, con l'apparato genitale femminile (utero) ripieno di uova.

Il ciclo biologico è indiretto. L'ospite definitivo vertebrato alberga nel suo intestino (principalmente tenue, a volte crasso) i parassiti adulti; le proglottidi gravide si staccano dal cestode e vanno a finire con le feci nell'ambiente. Alcune proglottidi possono essere visibili macroscopicamente nelle feci, a seconda delle dimensioni del parassita.

Le uova sono subito infestanti per l'ospite intermedio e si mantengono vitali e infestanti anche per parecchi mesi in attesa dell'arrivo di questo, un acaro della famiglia Oribatidae, coprofago e molto diffuso nel terreno al pascolo. Gli acari ingeriscono le uova che si aprono nella cavità celomatica dando origine alla forma larvale che è il metacestode e più in particolare un cisticercoide. Lo sviluppo del cisticercoide richiede dalle 6 alle 16 settimane. A questo punto l'ospite definitivo si infesta ingerendo l'acaro col cisticercoide all'interno. Quest'ultimo aderisce alle pareti dell'intestino tenue e in 1-2 mesi dà origine alla tenia adulta. Gli acari con relativi cisticercoidi rimangono nell'ambiente anche un anno rendendo possibile la reinfestazione tra stagioni di pascolo consecutive.

Tra i cestodi della capra il genere principale è *Moniezia*. Nonostante il ritrovamento di proglottidi nelle feci da parte degli allevatori e i reperti necroscopici del parassita adulto nell'apparato gastroenterico (a causa delle ingenti dimensioni) possano essere motivo di preoccupazione, questi parassiti ricoprono un ruolo

marginale nella sintomatologia clinica e determinano anche conseguenze subcliniche poco rilevanti. I capretti che frequentano pascoli infestati sono la categoria più suscettibile; in caso di carico elevato possono manifestare diarrea e ritardato accrescimento (Pugh & Baird, 2012).

I nematodi sono vermi tondi, hanno sessi separati, un corpo cilindrico e non sono segmentati. Il ciclo biologico è diretto con una fase endogena e una esogena. Gli adulti si accoppiano nel tratto gastroenterico dell'ospite e vengono prodotte delle uova, che contengono una morula, emesse nelle feci. Dalla morula matura una larva che generalmente schiude dall'uovo in L1 e muta in L2 e poi in L3 nell'ambiente; i tempi di evoluzione sono variabili a seconda del genere e a seconda delle condizioni ambientali di temperatura e umidità. Il passaggio da uovo emesso con le feci a L3 infestante avviene in un tempo minimo di 7 giorni in condizioni di temperatura e umidità ottimali. Lo stadio L3 sopravvive nell'ambiente per 2-3 mesi. Fanno eccezione i parassiti appartenenti alle famiglie Oxyuridea e Trichuroidea, le cui larve maturano allo stadio infestante all'interno delle uova senza schiudere. Per questo l'ospite definitivo si infesta mangiando le uova larvate che schiudono solo una volta arrivate nell'intestino.

L'infestazione avviene per ingestione diretta delle larve o delle uova per le famiglie sopra citate; *Strongyloides* e *Bunostomum* possono anche penetrare nell'ospite per via transcutanea. Da quando le larve vengono ingerite dall'ospite a quando maturano in parassiti adulti (periodo di prepatenza) passano 3-4 settimane.

I nematodi, se sono in condizioni poco favorevoli per il proprio sviluppo, possono sfruttare l'ipobiosi, diventano quiescenti senza scatenare risposta immunitaria dell'ospite per poi tornare in attività quando la loro riproduzione e sopravvivenza è garantita da condizioni ottimali.

I nematodi sono senza dubbio i parassiti più rilevanti nella capra e, seppur con alcune differenze, capre e pecore condividono la stessa popolazione parassitaria.

In Europa i generi più importanti in termini di patologia e perdita produttiva sono *Trichostrongylus*, *Haemonchus*, *Teladorsagia* e *Nematodirus*; altri come *Cooperia*, *Chabertia*, *Oesophagostomum* e *Marshallagia* possono essere considerati importanti

in alcune circostanze e solitamente fanno parte di un carico parassitario misto (Morgan & van Dijk, 2012).

Nel continente europeo *H. contortus* è più comune e di maggiore importanza patogenica nelle aree meridionali più miti, mentre *T. circumcincta* è il nematode dominante nelle regioni settentrionali e temperate. *Trichostrongylus* e *Nematodirus* sono ubiquitari e la loro importanza varia a livello locale, con il secondo più rilevante nelle aree più fredde. Tuttavia, negli ultimi anni si è assistito a un ampliamento delle aree di infestazione di queste specie, soprattutto un allargamento a nord di *Haemonchus*, in parte per i cambiamenti climatici e in parte per un maggiore ricorso del parassita all'ipobiosi che facilita la sopravvivenza all'inverno del parassita stesso (Morgan & van Dijk, 2012).

Teladorsagia è diffuso in tutte le zone temperate e subtropicali. L'insorgenza della sintomatologia può avvenire in due modi diversi: le larve appena ingerite aderiscono alla mucosa gastroenterica provocando una serie di segni clinici (patogenesi di tipo 1) oppure la sintomatologia può essere ritardata a quando le larve, dopo aver sfruttato l'ipobiosi per sopravvivere a condizioni poco favorevoli, riemergono dalla mucosa causando una lesione alle ghiandole gastriche (patogenesi di tipo 2) (Constable et al., 2017). Nelle aree temperate la sintomatologia da infestazione di tipo 1 si ha da metà estate a ottobre, mentre per il tipo 2 a fine inverno e primavera. Nelle zone subtropicali si ha insorgenza clinica con le piogge invernali (Constable et al., 2017). *Teladorsagia* è il parassita più abbondante nelle aree centrali e settentrionali del continente europeo. Il parassita causa una distensione delle ghiandole gastriche determinando iperplasia della mucosa, aumento del pH, aumento della permeabilità della mucosa con un incremento del pepsinogeno sierico; il segno clinico principale è la perdita di peso con diarrea proteino-disperdente, non necessariamente acquosa come nell'ostertagiosi bovina (Taylor et al., 2015).

Trichostrongylus ha un'epidemiologia simile a *Teladorsagia*. Nei climi temperati rappresenta raramente un patogeno primario ma è spesso un componente determinante nelle gastroenteriti parassitarie. Causa atrofia dei villi, dilatazione delle cripte intestinali e aumento della secrezione di muco, associato a iperplasia della mucosa e conseguente riduzione dell'assorbimento.

Nematodirus ha una maggior rilevanza nelle isole Britanniche ma anche nell'Europa settentrionale. L'effetto patogenico è imputabile alle larve che aderiscono alla mucosa intestinale, soprattutto a livello dell'ileo, causando erosione della mucosa e danno ai villi con conseguente atrofia. Gli scambi intestinali sono ridotti e si instaura diarrea che nei giovani determina facilmente disidratazione.

Haemonchus è un parassita molto importante per la sua prevalenza nelle aree equatoriali, aride, temperate e l'estensione della sua presenza anche ad aree più fredde, nonché per l'elevato potenziale patogenico, la sua capacità di sviluppare resistenza e la prolificità delle larve che determina un'ingente contaminazione ambientale di uova. I segni principali sono: anemia, edema sottomandibolare, cachessia e in misura minore diarrea. *Haemonchus* è infatti un parassita ematofago, ogni esemplare sottrae in media 0,05mL di sangue al giorno al suo ospite; il grado della patologia è determinato dalla carica parassitaria e dalla risposta dell'ospite alla perdita di proteine plasmatiche, emoglobina e altri costituenti ematici, che nel cronico possono portare a ipoferritinemia, deplezione delle cellule ematopoietiche e quindi anemia, anasarca, perdita di peso e morte (Constable et al., 2017).

2.1 Diagnosi delle endoparassitosi

La diagnosi indiretta in vitam per eccellenza è rappresentata dall'esame copromicroscopico. Si preleva materiale fecale a livello rettale e lo si analizza per individuare e identificare uova, larve e oocisti.

La morfologia delle uova all'esame copromicroscopico permette di distinguere tra quelle di cestodi, di vari generi di trematodi e di nematodi. Per questi ultimi, sono identificabili separatamente quelle appartenenti ai generi *Trichuris* e *Capillaria* (entrambi tricocefali), *Skrjabinema*, e tra quelle di strongili gastrointestinali (tendenzialmente indistinguibili tra loro) le uova appartenenti ai generi *Nematodirus/Marshallagia* (per la loro dimensione nettamente superiore) e *Strongyloides* (uovo di dimensioni inferiori, leggermente quadrangolare ed emesso già larvato) (Manfredi, 2006). In *figura 2* ci sono degli esempi dell'aspetto microscopico di alcuni elementi parassitari.

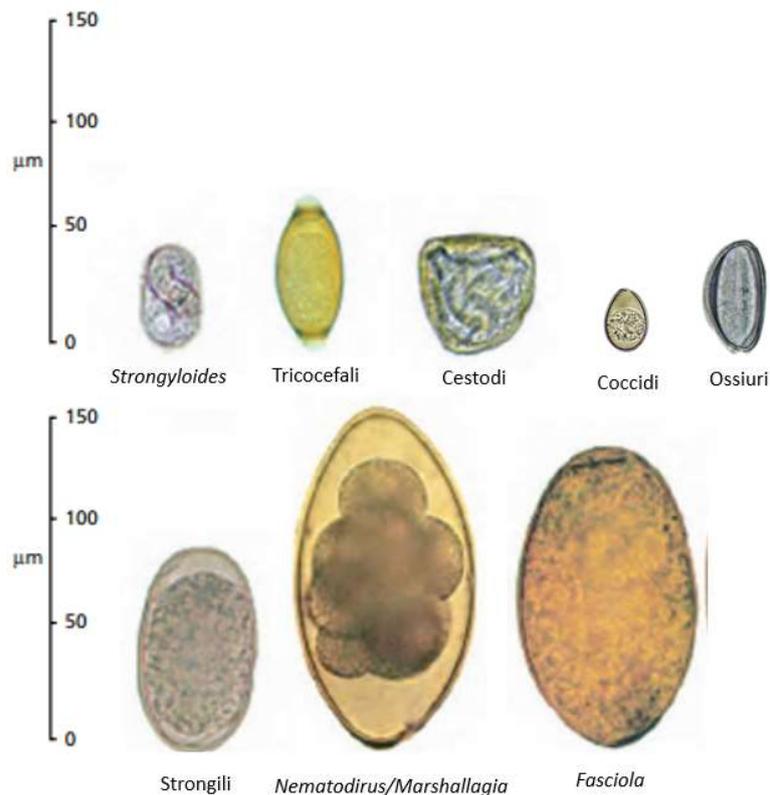


Figura 2: esempi di immagini microscopiche di alcuni elementi parassitari, adattato da Taylor et al. (2015).

Possiamo classificare le metodiche copromicroscopiche esistenti in qualitative e quantitative. Le prime consentono di valutare la presenza/assenza dei vari elementi parassitari nelle feci. Il metodo qualitativo più utilizzato è quello per sedimentazione e flottazione che consente, sfruttando una soluzione ad alto peso specifico, di separare gli elementi parassitari dal resto del contenuto delle feci. Le tecniche quantitative consentono di identificare e stimare un valore di uova/oocisti per grammo di feci (upg/opg). La tecnica di McMaster modificata è la più usata in assoluto e raccomandata dalla World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP).

Il valore di upg è utile per stimare la carica parassitaria nell'ospite, comparare l'efficacia di trattamenti antielmintici, determinare il corretto uso del farmaco, individuare i fenomeni di antielmintico-resistenza, monitorare il rischio di contaminazione del pascolo e verificare l'efficacia di piani di controllo. È meno indicato per dedurre lo stato clinico dell'animale a causa dei molti fattori intrinseci ed estrinseci che influenzano la produzione e il numero di uova emesse nelle feci (Manfredi, 2006). Infatti, ci sono specie parassitarie più e meno prolifiche; per

esempio, *Haemonchus* produce un numero di uova anche 300 volte maggiore rispetto a *Nematodirus* (Manfredi, 2006). Ci sono momenti di maggiore e minore escrezione di uova da parte dell'ospite; per esempio, prima e dopo il parto c'è un innalzamento rilevante dell'escrezione di uova nelle feci (noto come peri-parturient rise) (Chartier et al., 1998), che è osservabile anche nel picco di lattazione (lactation rise). Inoltre, è stata dimostrata una correlazione diretta tra la produzione di latte e la carica parassitaria (Chartier et al., 2000). Altri fattori intrinseci sono la longevità dei diversi generi di elminti e la risposta immunitaria dell'ospite. Da considerare anche l'errore relativo alla percentuale di acqua nelle feci, all'aumentare della quale si ha una maggiore diluizione delle uova; la distribuzione delle uova stesse nelle feci e l'errore dell'operatore nelle analisi di laboratorio sono altre variabili da tenere in considerazione (Manfredi, 2006).

Un altro fattore da considerare è la distribuzione aggregata della popolazione parassitaria all'interno di una mandria. Infatti, è stato dimostrato che l'80% dei parassiti risiede nel 20% degli animali (Hoste et al., 2002). Questo tipo di dispersione del carico parassitario si pensa che rifletta la variabilità individuale nell'acquisizione e nell'espressione della risposta immunitaria nei confronti degli elminti (Hoste et al., 2002). Infine, non esiste una esatta correlazione del valore di upg con il carico parassitario di parassiti adulti e tantomeno con il danno produttivo e patologico determinati nell'ospite.

Per i motivi sopraelencati, risulta evidente come la diagnosi di malattia parassitaria non può basarsi esclusivamente sul valore della FEC ma deve coinvolgere un'analisi clinica degli animali, delle condizioni di allevamento, la gestione del pascolo e soprattutto i trattamenti antielmintici effettuati per essere significativa ai fini di una decisione sul trattamento (Sargison, 2013). È riportato come basare i trattamenti antielmintici unicamente sulla carica parassitaria stimata dal fecal egg count (FEC) raramente porta a un miglioramento delle performance di allevamento (Morgan et al., 2005; Sargison, 2013).

Altre tecniche coprologiche recentemente entrate in uso sono il FLOTAC e il mini-FLOTAC, che hanno una sensibilità più alta rispetto al McMaster modificato, soprattutto con bassi valori di upg, e non richiedono particolari investimenti

laboratoristici; hanno un buon potenziale per standardizzare il calcolo della FEC nel prossimo futuro (Rinaldi & Cringoli, 2012).

Per superare i limiti nell'identificazione delle uova si sfrutta la metodica della coprocultura, inducendo la schiusa delle larve dalle uova, il loro sviluppo a L3 e analizzando la morfologia di queste ultime per poter distinguere i generi parassitari tra di loro. Per classificare le L3 nei diversi generi sono a disposizione molteplici chiavi morfometriche (tra le più comunemente impiegate troviamo quelle di van Wyk & Mayhew, 2013) che sfruttano parametri come, per esempio, la lunghezza della larva, la lunghezza della guaina e del filamento della coda, il numero di cellule intestinali e la forma della testa. In *figura 3* viene riportato un esempio di chiave morfometrica per la distinzione delle L3.

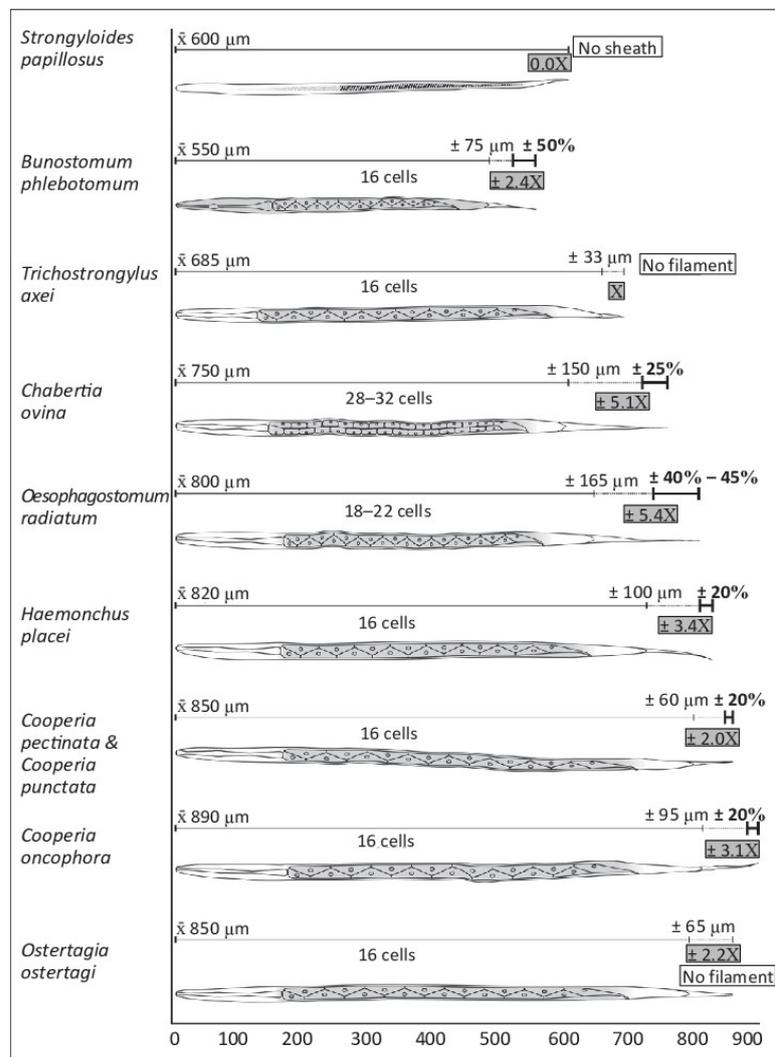


Figura 3: larve L3 dei più comuni nematodi dei piccoli ruminanti secondo van Wyk & Mayhew (2013).

Anche questa metodica, tuttavia, ha dei limiti: richiede almeno 7 giorni di maturazione delle uova, la schiusa non è omogenea tra i diversi generi e infine la differenziazione morfologica richiede molto tempo e un livello di esperienza e allenamento elevati (Roeber & Kahn, 2014).

Alle analisi coprologiche negli ultimi anni è stata affiancata con sempre maggior successo la diagnostica biomolecolare. Infatti, l'applicazione della PCR a materiale fecale non richiede molta formazione tecnica (dopo che le metodiche sono state messe a punto), i risultati ottenuti sono più specifici e sensibili, possono essere utilizzati campioni di matrice che non sarebbero sufficienti per le tecniche classiche copromicroscopiche, è veloce da condurre e riduce le variabili legate all'operatore in quanto ci viene restituito un risultato univoco sulla presenza del materiale genetico di diversi generi. La PCR consente di identificare la presenza di determinati generi parassitari nella matrice utilizzata sia qualitativamente che, con tecniche che sono in via di sviluppo e mostrano ottimi risultati preliminari, quantitativamente. Inoltre permette di individuare i generi resistenti agli antelmintici e rende possibile indagare sui geni di resistenza (Roeber & Kahn, 2014).

È possibile effettuare diagnosi diretta di endoparassitosi post mortem in sede di esame necroscopico; per risalire al genere parassitario è possibile ricorrere alla localizzazione all'interno dell'apparato gastroenterico, alle dimensioni del parassita adulto e alle caratteristiche morfologiche evidenziabili microscopicamente. In *tabella 1* vengono riportate due caratteristiche che permettono di fare una prima distinzione tra i principali endoparassiti, che per essere definitiva deve basarsi su caratteristiche morfologiche microscopiche o, in caso di incertezza, su tecniche biomolecolari:

Localizzazione	Dimensioni	Genere
Rumine/reticolo	M: 6-8mm F: 8-10mm	<i>Teladorsagia circumcincta</i>
	M: 10-13mm F: 15-20mm	<i>Marshallagia marshalli</i>
	2-3cm	<i>Haemonchus contortus</i>
	M: 3-6mm F: 4-8mm	<i>Trichostrongylus axei</i>
Piccolo intestino	M: 4-5,5mm F: 5,5-7,5mm	<i>Trichostrongylus colubriformis</i>
	M: 4,5-7mm F: 6-8mm	<i>Cooperia spp</i>
	M: 11-16mm F: 15-25mm	<i>Nematodirus spp.</i>
	1-3cm	<i>Bunostomum spp.</i>
	1cm	<i>Strongyloides spp.</i>
Cieco/colon	Fino a 600cm X 1,5cm	<i>Moniezia expansa</i>
	M: 11-16mm F: 13-24mm	<i>Oesophagostomum spp.</i>
	1,3-2cm	<i>Chabertia spp.</i>
	M: 3mm F: 6-7mm	<i>Skrjabinema spp.</i>
	M: 5-8cm F: 3,5-7cm	<i>Trichuris spp.</i>

Tabella 1: dimensioni e localizzazioni tipiche di alcuni parassiti gastrointestinali, dati tratti da Taylor et al. (2015).

Tuttavia, l'analisi post mortale ricopre un ruolo di scarso rilievo nella pratica, indirizzata perlopiù al riscontro di infestazioni da trematodi.

2.2 Gestione delle endoparassitosi

Le infestazioni da parassiti, come scritto in precedenza, sono perlopiù asintomatiche o subcliniche, ed endemiche in tutto il mondo. Questi assunti rendono chiaro come il tentativo di eradicare gli endoparassiti dall'allevamento sia un obiettivo che richiede sforzi troppo elevati e sia essenzialmente impossibile, oltre che probabilmente anche controproducente. L'obiettivo chiave della gestione delle endoparassitosi è quindi il mantenimento dei parassiti stessi a livelli di cariche

sufficientemente basse da prevenire le perdite produttive e l'insorgenza clinica di sintomi (Manfredi et al., 2010).

Un carico parassitario ridotto ma costante determina negli ospiti una costante stimolazione immunitaria, e una risposta immunitaria efficiente riduce i danni da infestazione parassitaria (Gilleard et al., 2021). Lo sviluppo di una adeguata immunità determina una riduzione dello sviluppo dei parassiti e della loro crescita, oltre che una riduzione della fertilità delle femmine e della produzione di uova (Hoste et al., 2010), che si traduce in minor danno alla mucosa gastrointestinale e minore contaminazione ambientale.

Nelle capre però, a differenza degli altri ruminanti, la risposta immunitaria non è così efficace né duratura; probabilmente la causa è da ricercare nelle loro abitudini alimentari: essendo brucatori e non pascolatori, i caprini sono sempre stati meno soggetti a entrare in contatto con gli stadi infestanti dei parassiti e quindi sviluppano una minore risposta immunitaria. Per questo stesso motivo, mentre negli altri ruminanti, animali più maturi sviluppano una risposta immunitaria buona e quindi sono tendenzialmente meno infestati rispetto ai giovani (che quindi si trattano di più), nelle capre la correlazione non è così immediata (Hoste et al., 2002, 2010).

Un'altra conseguenza diretta delle abitudini alimentari della capra è il miglior metabolismo epatico degli xenobiotici, presenti in maggior quantità in germogli, arbusti, frutti e foglie rispetto al foraggio di cui si nutrono i pascolatori. Questa capacità fa sì che anche i farmaci vengano metabolizzati più velocemente, compresi gli antelmintici. È stato dimostrato che trattare le capre alla dose riportata per le pecore rappresenta un sottodosaggio che risulta in una ridotta efficacia del farmaco; la dose da utilizzare nella capra deve essere da 1,5 a 2 volte superiore a quella riportata per la pecora, a seconda del farmaco che si considera (Hoste et al., 2010). Questo fenomeno può anche in parte spiegare perché la prevalenza di antelmintico-resistenza nei nematodi sia più alta nelle capre che nelle pecore (Hoste et al., 2010).

Quello farmacologico è stato il principale approccio alla gestione dei nematodi gastrointestinali nel mondo dell'allevamento negli ultimi 50 anni (Gilleard et al., 2021). Grazie alla loro economicità, facilità di utilizzo ed efficacia sono stati usati in un modo spropositato e spesso immotivato.

Le classi di molecole più utilizzate a questo scopo sono 3: benzimidazolici, lattoni macrociclici e imidazotiazolici-tetraidropirimidine; a questi si sono affiancati dalla loro entrata in commercio nel 2010 (ben 25 anni dopo la presentazione dell'ultima molecola antielmintica) i derivati dell'amino-acetonitrile (monopantel), e dal 2012 gli spiroindoli (derquantel).

- Benzimidazolici (BZ): agiscono principalmente con tre meccanismi: interferiscono con la sintesi della tubulina, interferendo con la polimerizzazione della β -tubulina, e quindi sul metabolismo del glucosio; inibiscono la fumarato-reduttasi mitocondriale e quindi la trasformazione del glucosio in energia; infine disaccoppiano la fosforilazione ossidativa.
- Lattoni macrociclici (LM): agiscono direttamente sulla neurotrasmissione inibitoria causando paralisi flaccida in diversi modi: potenziano il neurotrasmettitore inibitorio (GABA), agiscono direttamente sul recettore attivandolo oppure una somma di questi due meccanismi che determina influsso nella cellula muscolare di ioni Cl^- e conseguente iperpolarizzazione.
- Imidazotiazolici-tetraidropirimidine: al contrario agiscono direttamente sulla neurotrasmissione eccitatoria, con un effetto mimetico del neurotrasmettitore eccitatorio putativo (acetilcolina) sul recettore colinergico, causando depolarizzazione della cellula muscolare e una risposta contratturale prolungata con conseguente distacco dell'elminta.
- Derivati dell'amino-acetonitrile: agiscono su recettori nicotinici specifici dei nematodi, potenziando la neurotrasmissione inibitoria.
- Spiroindoli: agiscono sulla neurotrasmissione inibitoria bloccando la trasmissione neuromuscolare, causando paralisi flaccida (Abongwa et al., 2017; Carli et al., 2008)

Nel frattempo, per cercare di mantenere l'efficacia dei farmaci ritardando l'insorgenza della resistenza, sono state inserite in commercio combinazioni di 2, 3 o 4 molecole diverse. Questo escamotage ha solo ritardato l'insorgenza di multi-resistenza alle diverse molecole. In Italia, comunque, al momento sono registrati pochissimi farmaci con combinazione di, al massimo, due molecole.

Per ogni molecola, dopo meno di 10 anni dalla sua entrata in commercio, si è assistito a una riduzione dell'efficacia per l'insorgenza di resistenza nei parassiti (Gilleard et al., 2021). Già nei primi anni 2000 ci sono stati dei report di multi-resistenza a più molecole, soprattutto in Sud America, Sudafrica e Stati Uniti sud-orientali, poi estesa a Nuova Zelanda e Australia. Lievemente differita nel tempo, anche in Europa la prevalenza di resistenza a tutti i principali antelmintici è diventata preoccupante già intorno al 2010.

3. ANTIELMINTICO RESISTENZA

La resistenza è la capacità ereditabile di un parassita di sopravvivere a un trattamento con antelmintico; da questa definizione si può capire come sia legata a geni di resistenza. Un parassita è detto resistente se sopravvive dopo l'esposizione alla dose raccomandata di un antelmintico. Una popolazione è detta resistente se più del 5% dei parassiti sopravvive al trattamento; tuttavia se non lo si ricerca con metodi di laboratorio, il calo di efficacia farmacologica viene evidenziato da cali della produzione o dalla presenza di segni clinici solo quando intorno al 50% di parassiti sono già resistenti nella popolazione (SCOPS).

Come abbiamo detto, il trattamento farmacologico è attualmente uno strumento essenziale nel controllo dei parassiti, pertanto la preservazione dell'efficacia delle molecole disponibili è fondamentale per evitare dei danni enormi sia in termini di produttività che di benessere animale.

Lo scorretto utilizzo degli antelmintici si basa su diversi errori: trattamenti troppo frequenti, mancata rotazione delle classi farmacologiche utilizzate, trattamenti a tappeto e sotto-dosaggio sono alcuni di essi.

All'inizio degli anni '70 gli allevatori hanno iniziato ad usare gli antelmintici che presentavano numerosi vantaggi rispetto alle sostanze chimiche precedentemente in uso in termini di spettro di azione, potenza e sicurezza. Dai primi anni '80 con l'entrata in commercio dei lattoni macrociclici si è rafforzata ancor di più la posizione di dominanza dei metodi farmacologici nel controllo dei parassiti. Già pochi anni dopo la loro introduzione sul mercato vengono riportati dei casi di resistenza ai

benzimidazolici, e nella seconda metà degli anni '80 per l'ivermectina (Gilleard et al., 2021).

L'insorgenza della resistenza è inevitabile quando si inizia ad usare una molecola; i parassiti infatti hanno delle caratteristiche che li rendono molto veloci a selezionare nella popolazione individui resistenti, come il ciclo di vita breve, l'elevato potenziale biotico, l'alto tasso di mutazione genetica e la grande numerosità delle popolazioni. Se non si può evitare l'insorgenza, si può però ridurre l'entità e la rapidità con cui si manifesta la resistenza. Ci sono infatti dei fattori che influenzano il tasso di insorgenza della resistenza (SCOPS, 2020):

- La diluizione dei parassiti che sopravvivono al trattamento con i parassiti non selezionati: questo fattore è alla base del concetto di *refugia*, fondamentale per la gestione dei trattamenti antielmintici in maniera sostenibile. Per ridurre la pressione selettiva della resistenza in una popolazione di nematodi, i parassiti che sopravvivono a un trattamento farmacologico devono essere diluiti dalla presenza di larve infestanti che non possiedono geni di resistenza, per ridurre il contributo relativo alle successive infestazioni dei parassiti resistenti. Le popolazioni di parassiti nei *refugia* esistono come larve nell'ambiente espulse prima del trattamento antielmintico e come parassiti adulti presenti in animali non trattati (van Wyk, 2001). Inoltre bisogna considerare la proporzione tra parassiti negli ospiti e parassiti nell'ambiente al momento del trattamento: se la maggior parte dei parassiti è presente nell'apparato gastrointestinale dell'ospite come nematode adulto al momento del trattamento c'è un'alta selezione per la resistenza; infatti gli animali trattati espelleranno uova resistenti che non vengono adeguatamente diluite da quelle suscettibili presenti nell'ambiente in un numero non sufficiente. Per lo stesso motivo è assolutamente sconsigliato trattare gli animali appena entrati in un pascolo o stalla "puliti" (Rose Vineer et al., 2020).

- La proporzione dei parassiti resistenti in un allevamento: l'efficacia di un trattamento influenza anche la percentuale di animali da non trattare per garantire un *refugia* che funga da diluizione efficace ai parassiti resistenti. Infatti, se sopravvive un piccolo numero di parassiti resistenti a un trattamento, sono sufficienti pochi genotipi sensibili per ottenere una diluizione efficace. In numeri,

in una popolazione che viene trattata con un'efficacia del 99,9%, basterebbe non trattare l'1% degli animali per garantire una diluizione di 10 volte dei parassiti resistenti; se l'efficacia cala al 95% (benchmark di efficacia di un trattamento antielmintico) servirebbe il 34% di animali non trattati per una diluizione simile (Besier, 2012). In un gruppo di animali senza problemi di antielmintico-resistenza secondo alcuni basterebbe lasciare il 4% di adulti non trattati per posticipare la selezione per la resistenza senza compromettere il controllo dei parassiti (Dobson et al., 2012), mentre per altri bisognerebbe garantire il 10-20% di non trattati selezionati tra gli animali con meno problemi di salute (Kaplan, 2020).

- La frequenza di utilizzo degli antielmintici e la scelta della molecola: entrambi questi fattori andrebbero ponderati sulla situazione individuale del gruppo di animali, tenendo in considerazione che ogni trattamento elimina i parassiti suscettibili e seleziona parassiti resistenti; alcuni studi dimostrano come possa insorgere resistenza anche a basse frequenze di trattamento (Zanzani et al., 2014). Negli Stati del Centro e Nord Europa si ha la tendenza a trattare più frequentemente, mentre in Italia c'è la tendenza a trattare 1 o 2 volte all'anno, o anche non regolarmente ogni anno (Zanzani et al., 2014); questo potrebbe giustificare la minor prevalenza di antielmintico resistenza nel nostro rispetto ad altri Paesi (Rose Vineer et al., 2020). La scelta della molecola è un altro punto delicato; l'uso di una stessa molecola fino all'insorgenza della resistenza è altamente sconsigliato perché quando si arriva a questo punto il gene di resistenza è fissato in una grande percentuale della popolazione parassitaria, rendendo impossibile la reintroduzione del farmaco oggetto della resistenza. La rotazione dei gruppi di antielmintici era ritenuta essere efficace nel prevenire questo problema (Dobson et al., 2012) ma oggi è considerata inefficace; anzi, darebbe all'allevatore e al veterinario un falso senso di tranquillità. Ad alte prevalenze di resistenza è infatti probabile che la rotazione trasformi un farmaco prima efficace in inefficace, determinando la comparsa di genotipi resistenti a più farmaci (multiple drug resistant). Al posto di questa pratica sarebbe meglio adottare un protocollo di somministrazioni combinate di antielmintici che massimizzano l'efficacia del trattamento diminuendo il numero di

parassiti sopravvissuti; meno parassiti resistenti sopravvivono, maggiore è la diluizione degli stessi all'interno del *refugia* (Kaplan, 2020).

- L'efficacia di ogni trattamento: è garantita da un corretto dosaggio e assicurandosi che la dose di farmaco venga assunta correttamente dall'animale. I fattori di rischio principali del sottodosaggio nelle capre sono il già citato errore nel riportare una posologia uguale per pecora e capra e la sottostima del peso degli individui, un errore comune tra allevatori e veterinari (Kaplan, 2020). Posto che ogni singolo animale dovrebbe essere pesato e venire trattato con una dose adeguata di farmaco, è sufficiente che nella pratica vengano costituiti dei gruppi di animali simili in quanto a taglia, pesato l'animale più grosso e trattato tutto il gruppo con la dose relativa a quest'ultimo.

Recentemente, grazie al lavoro dell'azione COST del COMBAR (www.combar-ca.eu), è stato prodotto un database epidemiologico costantemente aggiornato in cui vengono raccolti tutti gli studi e le pubblicazioni relativi alla ricerca di antelmintico resistenza nei ruminanti in Europa. Nelle varie pubblicazioni considerate c'è generalmente una forte eterogeneità tra i risultati anche nella stessa regione; i motivi sono da ricercare nell'ampio lasso di tempo preso in considerazione (1980-2020) e nella mancanza di standardizzazione del metodo di ricerca (Rose Vineer et al., 2020). In ogni caso la prevalenza di resistenza in Europa è preoccupante; come si può vedere in *tabella 2*, il 51% dei gruppi di capre testati sono risultati resistenti per i bezimidazolici, il 44% per i lattoni macrociclici, mentre la prevalenza è minore per le altre classi di farmaci.

Classe farmacologica	Prevalenza (DS)	Studi	I ²	Prevalenza (n>9)	Studi (n>9)	I ² (n>9)
Benzimidazolici	0,51 (0,17)	31 (29)	0,86	0,52 (0,16)	12 (11)	0,94
Levamisolo	0,2 (0,04)	11 (11)	0,68	0,21 (0,03)	4 (4)	0,54
Lattoni macrociclici	0,44 (0,18)	27 (24)	0,79	0,43 (0,18)	7 (7)	0,94
Moxidectina	0,01 (0,01)	7 (7)	0	0 (0)	1 (1)	/
Monepantel	0 (0)	2 (2)	0	0 (0)	1 (1)	/

Tabella 2: La prevalenza (deviazione standard tra parentesi) è pesata sulla dimensione del campione, divisa in base alla classe farmacologica e alla specie. I^2 è una misura dell'eterogeneità, più il valore è alto più è elevata. Il numero degli studi (il numero di quelli pubblicati è tra parentesi) indica il numero di gruppi testati, che possono essere più di uno per pubblicazione. Le colonne etichettate con "n>9" prendono in considerazione solo gli studi con 10 o più allevamenti (Rose Vineer et al., 2020).

Negli Stati Uniti la situazione non è migliore, con degli studi relativi alle pecore che hanno riscontrato *Haemonchus contortus* resistente nel 91-100% dei casi ai benzimidazolici, nel 13-54% dei casi al levamisolo, nel 38-94% all'ivermectina e nel 3-56% alla moxidectina. Un altro dato preoccupante è la prevalenza degli allevamenti con parassiti resistenti a tutte le classi di antielmintici, che è arrivata anche al 30% dei gruppi in alcune regioni (Kaplan, 2020).

Negli ultimi anni sono aumentati esponenzialmente i report di antielmintico resistenza ma fino a qualche anno fa si credeva che questo fenomeno fosse diffuso solo in alcune regioni, in quanto non c'erano studi che ne provassero la presenza in tutti i Paesi. Tuttavia, da questa ampia metanalisi del COMBAR, e in particolare nel grafico 5, si può notare come la prevalenza della resistenza sia direttamente correlata allo sforzo di ricerca della stessa (Rose Vineer et al., 2020).

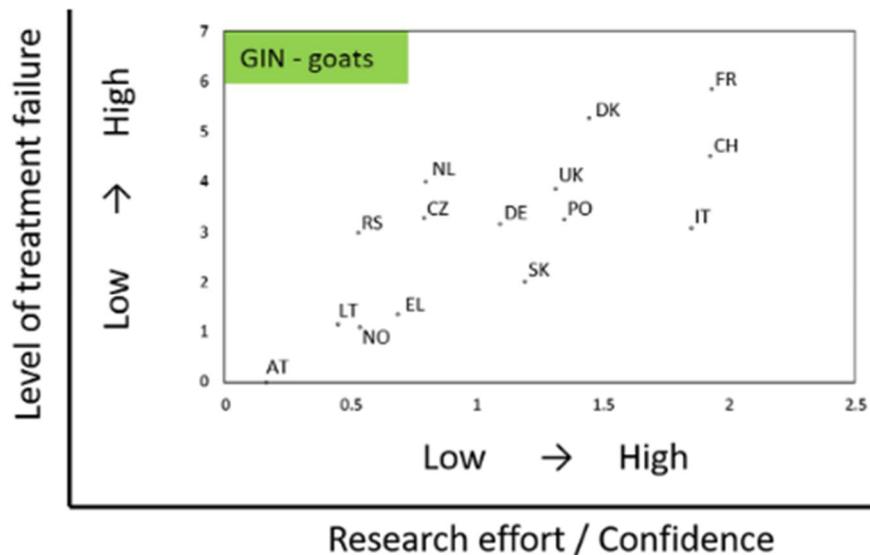


Grafico 5: viene mostrata la correlazione diretta tra sforzo nella ricerca e prevalenza di resistenza (Rose Vineer et al., 2020).

Da questo grafico si può anche notare come l'Italia si discosti da questa proporzione. Infatti, nonostante lo sforzo di ricerca sia tra i più elevati, la resistenza risulta su livelli più bassi rispetto ad altre nazioni.

3.1 Diagnosi di antielmintico resistenza

Una condizione fondamentale per poter gestire correttamente l'antielmintico resistenza è saperla diagnosticare. Basarsi solo su segni macroscopici di allevamento può portare a situazioni di non ritorno. La prevalenza in allevamento può passare da inavvertibile a un livello clinicamente significativo in un breve periodo di tempo; di conseguenza, a meno che ci sia un programma di monitoraggio dell'effettiva efficacia dei trattamenti farmacologici, la resistenza non sarà notata finché non raggiungerà livelli preoccupanti (Kaplan, 2020).

La metodologia di elezione per la diagnosi è il test di riduzione della FEC (FEC reduction test, FECRT). Consiste nell'effettuare due campionamenti per ogni animale del campione aziendale (minimo 10 animali); il secondo viene programmato a una distanza temporale variabile dal primo a seconda della molecola utilizzata per il trattamento antielmintico, che viene somministrato contestualmente al primo

campionamento. Per i benzimidazolici il lasso di tempo indicato è di 10-14 giorni, mentre per i lattoni macrociclici è di 14-17 giorni. I campioni vengono sottoposti individualmente ad un esame copromicroscopico quantitativo per valutare la FEC nei campioni raccolti prima del trattamento e dopo il trattamento. Tramite questo test si ottengono dati che permettono di valutare con precisione la percentuale di efficacia dell'antelmintico utilizzato mediante un confronto tra la FEC pre e post trattamento. Dei limiti di questa metodologia sono la scarsa sensibilità in caso ci siano meno del 25% di parassiti resistenti (Coles et al., 2006) e l'impossibilità di discriminare la prevalenza relativa dei vari generi solo attraverso l'identificazione di uova (aggirabile tramite una coprocoltura e identificazione di larve L3). Recentemente è stato stilato un protocollo dal COMBAR che permette una standardizzazione del FECRT nei ruminanti (Allegato I).

Nella pratica il monitoraggio dell'efficacia farmacologica basato sul FECRT effettuato su campioni individuali, risulta molto dispendioso in termini economici e di tempo, rendendo gli allevatori e i veterinari riluttanti ad aumentare le investigazioni basate sulla FEC. Quello che ne risulta è un raro o nullo ricorso alla diagnosi tramite indagini coprologiche. Il monitoraggio coprologico può diventare più accessibile e adottato riducendo il numero di analisi FEC individuali tramite l'utilizzo di pool pre e post trattamento (Rinaldi et al., 2019); questi pool sono formati da un omogenizzazione di aliquote fecali uguali da ogni animale. Nonostante la metodica di FECRT mediante pool non sia ancora standardizzata, ci sono diversi studi che dimostrano la congruenza tra i risultati del test condotto con pool di diverse dimensioni e il test classico individuale (Kenyon et al., 2016; Rinaldi et al., 2014). Questa variante del FECRT classico consentirebbe di ridurre drasticamente i tempi e i costi delle analisi e quindi possiede un ottimo potenziale per il monitoraggio futuro sia del carico parassitario di stalla (FEC), sia dell'efficacia degli antelmintici (FECRT) (Rinaldi et al., 2014). Tuttavia, si perde la possibilità di calcolare un intervallo di confidenza, e ciò va considerato al momento dell'interpretazione del risultato (Kaplan, 2020).

Un'altra tecnica, semplice e veloce, per avere un'indicazione dell'efficacia di un trattamento consiste nell'effettuare una sola indagine copromicroscopica per la valutazione della FEC 14 giorni dopo il trattamento antelmintico con benzimidazolici o lattoni macrociclici ("drench test"). In assenza di uova si può ritenere il trattamento

efficace ma ci sono dei limiti per quanto riguarda la percentuale di efficacia del farmaco, che non è calcolabile non avendo il riferimento del pre-trattamento. C'è inoltre la possibilità (remota) che gli animali non fossero parassitati prima del trattamento e infine la positività al test è meramente un indicatore dell'inefficacia del trattamento e non necessariamente di antielmintico-resistenza (SCOPS).

Altre metodiche sono i test in vitro di schiusa delle uova (egg hatch test), valido solo per la resistenza ai benzimidazolici, e di sviluppo larvale, valido solo per benzimidazolici e lattoni macrociclici (Coles et al., 2006). L'egg hatch test si basa sull'utilizzo di una determinata dose di tiabendazolo che dovrebbe limitare la schiusa almeno del 99% delle uova presenti in un campione; il numero di uova che schiudono viene utilizzato per stimare la percentuale di uova resistenti ai benzimidazolici presenti nel campione. Il test di sviluppo larvale si basa sul medesimo principio ma vengono utilizzati benzimidazolici e lattoni macrociclici al momento della schiusa per identificare eventuali larve che si sviluppano nonostante la presenza dell'antielmintico.

Oltre a queste metodiche classiche, la biologia molecolare sta diventando sempre più importante nella ricerca della resistenza agli antielmintici. Tramite la codifica del materiale genetico è possibile confrontare le differenze tra il DNA delle popolazioni suscettibili e di quelle resistenti. Queste differenze genetiche potrebbero essere correlate a una modificazione dei recettori per i farmaci o ad un'evoluzione nel metabolismo del parassita per cui viene regolata la quantità di farmaco che raggiunge il recettore. Un altro utilizzo delle metodiche biomolecolari è la ricerca di polimorfismi genetici che agiscono come marker di resistenza (Kotze et al., 2020). Ad oggi è noto che la resistenza ai benzimidazolici sia data da una modifica del gene che codifica per la β -tubulina (target dei BZ), mentre per le altre molecole non ci sono ancora marker specifici (Coles et al., 2006). La biologia molecolare ci permette anche di quantificare la composizione del carico parassitario per specie.

Le metodiche biomolecolari hanno vantaggi sulle altre metodiche citate in termini di tempo, di sensibilità, di campionamento (non è necessario prendere campioni prima e dopo il trattamento come la metodica FECRT e non è necessario

nemmeno usare molecole come nelle tecniche in vitro); permettono di testare molecole multiple su diverse specie di parassiti, hanno meno variabili e il costo della singola analisi è minore rispetto alle altre metodiche, sebbene le attrezzature siano molto costose (Kotze et al., 2020). Le tecniche biomolecolari sono in continua implementazione per l'utilizzo di campo visti i vantaggi che apportano; un primo passo potrebbe essere l'affiancamento alle metodiche tradizionali per aumentare la sensibilità o ridurre i tempi di alcuni passaggi (Kotze et al., 2020).

3.2 Strategie per il controllo dell'antelmintico resistenza

Date le precedenti premesse si capisce come affrontare il problema delle endoparassitosi solo con un approccio farmacologico e senza valutarne l'effettiva efficacia renda probabile l'insorgenza del problema dell'antelmintico-resistenza. Di contro, bisogna garantire elevati livelli produttivi e di benessere animale (Kenyon et al., 2009). Per un approccio sostenibile alle endoparassitosi è imprescindibile una gestione integrata della problematica, che associ il trattamento farmacologico ad una serie di altre pratiche quali la stimolazione immunitaria (per esempio selezionando capi con un'immunocompetenza maggiore nei confronti dei parassiti, oppure utilizzando vaccini che stanno iniziando ad entrare nel mercato), l'adozione di corrette pratiche ambientali (evitare densità elevate, mantenere una buona pulizia della lettiera ed evitare di fornire foraggio sulla lettiera, una corretta gestione del pascolo, ecc.) e di management del gregge (per esempio evitare la presenza contemporanea al pascolo di esemplari di greggi diversi o di individui dello stesso gregge ma di categorie o età differenti, come capretti e adulti), l'impiego di antelmintici naturali (ci sono studi che dimostrano l'efficacia di integratori a base di rame sulla riduzione della FEC di *Haemonchus contortus*, inoltre ci sono moltissimi studi sull'efficacia dell'utilizzo di nutraceutici di origine vegetale e di funghi nematofagi nel ridurre il carico parassitario e l'escrezione di uova) (Hoste et al., 2011).

Per quanto riguarda l'uso dei trattamenti farmacologici ci sono comunque ampi margini di miglioramento del loro utilizzo ai fini della diminuzione del rischio di antelmintico resistenza. Dal concetto di *refugia* deriva la necessità di non trattare

indiscriminatamente gli animali ma di effettuare dei trattamenti selettivi. A questo scopo sono stati introdotti i concetti di *Targeted Treatment* (TT) e *Targeted Selective Treatment* (TST).

Il trattamento selettivo (TT) è un trattamento mirato di gruppo; consiste nel trattare tutti gli animali del gregge in momenti, circostanze o categorie di animali specifici (Bath & van Wyk, 2009). In diversi studi è stato provato come trattare animali allo svezzamento o al momento del parto sia efficace e non correlato negativamente alla produttività. Inoltre questo metodo permette di gestire i trattamenti in base al carico parassitario nei diversi periodi dell'anno (Charlier et al., 2014). Secondo Charlier gli indicatori per scegliere di effettuare un trattamento selettivo sono il modo in cui viene gestito il pascolo, la FEC e il momento del parto per gli adulti.

Il trattamento selettivo individuale (TST) può essere definito come un sistema nel quale gli animali da trattare vengono selezionati su base individuale, usando uno o più criteri di selezione (Bath & van Wyk, 2009; Kenyon et al., 2009). Questo metodo è idealmente il migliore in quanto consentirebbe di ridurre al minimo l'uso del farmaco trattando gli animali a rischio di insorgenza clinica o di perdita produttiva preservando al contempo parassiti suscettibili nel *refugia*. Tuttavia, la parte più complessa di questo tipo di gestione è la scelta dei criteri della selezione (Bath & van Wyk, 2009; Hoste et al., 2002; Kenyon et al., 2009).

Inizialmente si è preso in considerazione l'uso della sola FEC; infatti la distribuzione aggregata della popolazione parassitaria giustificherebbe il trattamento di pochi animali con un dato di upg maggiore per migliorare la loro situazione clinica e ridurre di molto la contaminazione ambientale (Hoste et al., 2002). Tuttavia, è stato dimostrato come sia rischioso usare solamente il dato della FEC in quanto non indicativo del significato clinico dell'infestazione nell'individuo (Morgan et al., 2005; Sargison, 2013), oltre che dispendioso dal punto di vista gestionale ed economico.

Per la gestione individuale dei trattamenti è stato proposto un metodo che prende il nome di FAMACHA® (van Wyk & Bath, 2002), basato sulla valutazione del colore della mucosa congiuntivale per stimare il grado di anemia. Questo segno patologico è il più caratteristico di infestazione da *Haemonchus* e altri parassiti ematofagi e risulta particolarmente efficace come indicatore di trattamento nelle aree/aziende in cui

Haemonchus è il parassita dominante. Tuttavia, a causa della prevalenza di infestazioni miste in Europa, questo parametro, se usato da solo, difficilmente rappresenta le condizioni reali del carico parassitario dell'animale (Charlier et al., 2014).

Un'altra proposta prende il nome di Five Point Check (Bath & van Wyk, 2009), un metodo pragmatico che consiste nella valutazione di cinque diverse aree del corpo dell'animale per individuare alterazioni:

- Naso: presenza di scolo da miasi (valido per le ectoparassitosi).
- Occhi: valutazione del colore della congiuntiva per individuare eventuali stati anemici, riconducibile al FAMACHA.
- Mandibola: ingenti parassitosi gastrointestinali possono determinare stati di iponutrizione tali da causare ipoalbuminemia e ipoproteinemia; queste condizioni causano edema che si rende più visibile proprio a livello sottomandibolare.
- Dorso: valutazione del BCS; secondo gli autori più di un punto di differenza nello score BCS di un capo rispetto alla media degli score dei capi dello stesso gruppo (raggruppando per condizione fisiologica, per esempio gravidanza, lattazione, neonati, ecc.) potrebbe essere indicativo di endoparassitosi cliniche.
- Coda: valutare l'area perineale alla ricerca di imbrattamento fecale, segno di diarrea. Viene a tal proposito individuato un "dag score", ovvero un indice progressivo di imbrattamento.

Questo metodo risulta molto semplice e significativo in quanto un solo parametro non è affidabile per selezionare gli animali da trattare anche a causa delle diverse manifestazioni cliniche legate alla moltitudine di generi parassitari (van Wyk & Bath, 2002); in *figura 4* si può vedere un depliant che è stato prodotto per essere distribuito agli allevatori per l'applicazione del metodo Five Points Check.

Altri indici che possono essere usati per la selezione dei capi da trattare sono: il tasso di crescita nei capretti e la produzione latte che, nella capra, al contrario della vacca, è risultato essere un indice efficace; le capre ad alta produzione, infatti, risultano essere meno resistenti e resilienti alle infestazioni, e quindi da trattare (Charlier et al., 2014).

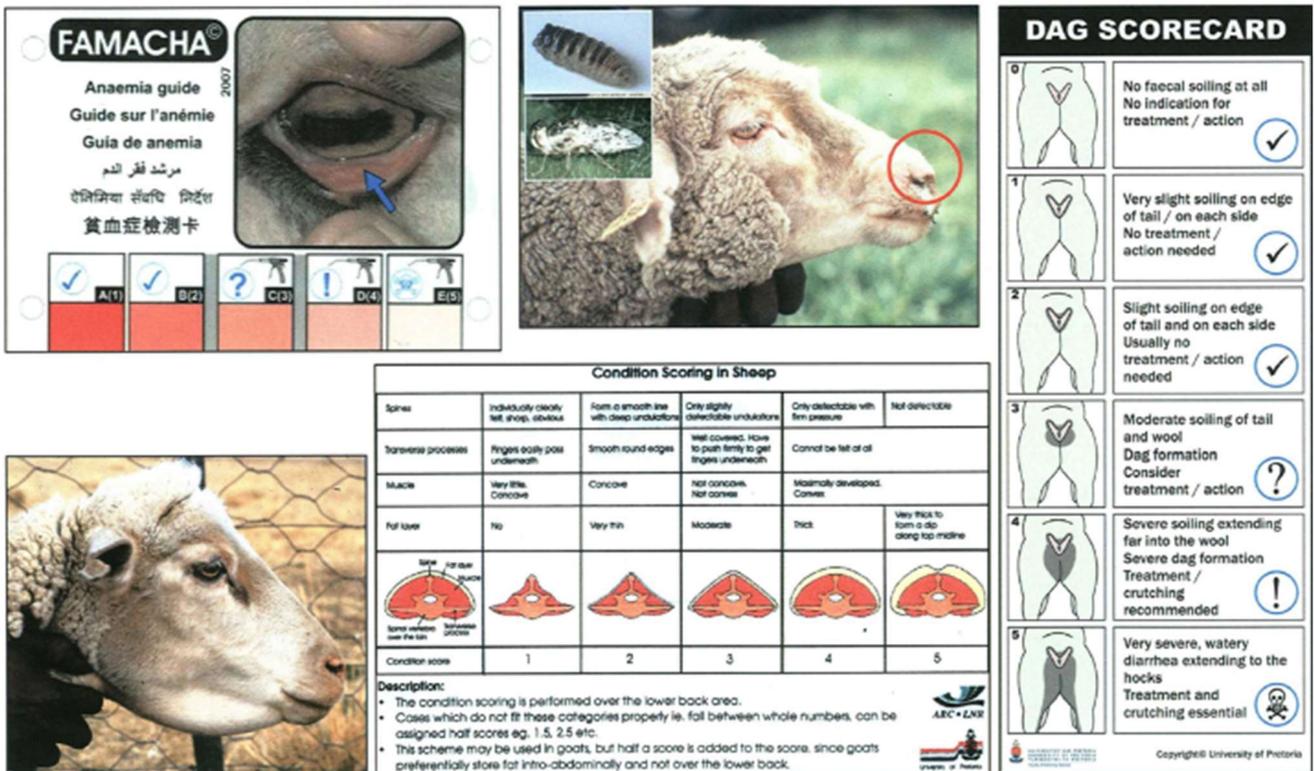


Figura 4: semplice e pratico riassunto del Five Points Check da Van Wyk e Bath (2009)

In generale, aziende con cariche parassitarie elevate beneficiano più dal trattamento selettivo, mentre in greggi con cariche intermedie o basse i TST sono economicamente interessanti per ottimizzare i trattamenti (Charlier et al., 2014).

In uno studio durato 5 anni sono stati comparati 4 gruppi di agnelli trattati sempre con ivermectina ma con diversi metodi di trattamento: tutto il gregge ogni 4 settimane (NST), trattamento selettivo individuale basato sulla performance individuale (TST), trattamenti strategici di tutto il gregge in determinati periodi prestabiliti (SPT) e trattamento del gregge intero alla comparsa di sintomi clinici (MT). I risultati hanno dimostrato come un protocollo basato sul trattamento selettivo (TT o TST) abbia un'efficacia maggiore rispetto al trattamento "alla cieca", non determini delle perdite

produttive maggiori, consenta un risparmio diretto per il minor consumo del farmaco e freni l'insorgenza di resistenza (Kenyon et al., 2013).

Nonostante gli approcci basati sul concetto di *refugia* siano ritenuti inequivocabilmente efficaci nella gestione dell'antelmintico resistenza, e nonostante anche molti allevatori ne siano convinti, all'atto pratico l'applicazione di queste pratiche risulta ancora molto ostacolata. Infatti, questi metodi richiedono parecchio tempo per la valutazione clinica dell'individuo, per le analisi copromicroscopiche, oltre ad un investimento in denaro di cui difficilmente l'allevatore riesce a vedere il ritorno. Per quanto riguarda quest'ultimo punto, tuttavia, è stato stimato che il costo dell'antelmintico resistenza nei 18 Paesi aderenti alla ricerca COMBAR solo nel settore delle capre da latte superi il milione di euro (Charlier et al., 2020).

Un passo importante sarebbe l'implementazione dei criteri di selezione per il trattamento all'interno della routine, come per esempio i controlli funzionali in relazione alla produzione lattea individuale oppure una pesa quotidiana dei capi tramite un'identificazione elettronica automatizzata (Besier, 2012). In un sistema produttivo come quello caprino in Italia, basato su allevamenti con relativamente pochi capi che vengono munti quotidianamente, risulterebbe meno complicata l'applicazione di una routine di valutazione individuale dei capi rispetto a realtà con molti capi allo stato brado o semi-brado.

Un'altra buona pratica gestionale per rallentare l'insorgenza di resistenza in un gruppo di animali è stabilire una quarantena per i nuovi animali in ingresso. L'introduzione di nuovi animali in stalla infatti è stato suggerito essere uno dei principali meccanismi di propagazione della resistenza (Cringoli et al., 2007).

PARTE SPERIMENTALE

4. OBIETTIVI DELLO STUDIO

Lo sforzo di ricerca impegnato nell'ambito delle parassitosi nelle capre è sempre stato limitato. Per questo motivo non sono riportati casi di antielmintico resistenza nella specie caprina nel territorio in cui si è focalizzata questa indagine. Tra allevatori e medici veterinari operanti sul territorio interessato da questo studio sono, tuttavia, iniziati a sorgere dubbi sull'efficacia dei trattamenti antielmintici che vengono effettuati sugli animali.

Questa indagine si pone all'interno di un progetto di dottorato del Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute dell'Università di Padova che ha come obiettivi:

- Validare e mettere a punto un protocollo di valutazione quantitativa della carica parassitaria e del suo livello di diminuzione a seguito del trattamento per il genere *Haemonchus* e per l'insieme degli strongili gastro-intestinali in un gruppo di animali tramite identificazione biomolecolare;
- Valutare la presenza di resistenza tra i piccoli ruminanti allevati nell'Italia nord-orientale.

Questa tesi si inserisce nel primo obiettivo; con l'intento di validare la metodica è stata valutata la riduzione dell'efficacia di molecole antielmintiche nei confronti di nematodi gastro-intestinali quale manifestazione di antielmintico resistenza. Inoltre, mediante coprocultura, sono stati individuati i generi di nematodi presenti pre e post trattamento.

5. MATERIALI E METODI

5.1 Area di studio

Lo studio è stato condotto nell'Italia nord-orientale. Nei territori montuosi di quest'area gli allevamenti caprini sono principalmente costituiti da un numero ridotto di capi, mentre nei fondivalle e nelle zone pianeggianti e collinari esistono anche realtà di allevamenti intensivi focalizzati sulla produzione lattea. La maggior parte delle aziende procede alla trasformazione casearia del proprio latte.



Figura 5: esempio di management degli animali in zone montane.

Le razze maggiormente presenti sono la Saanen, la Camosciata delle Alpi e la Passiria, tenute a stabulazione libera spesso con l'utilizzo del pascolo o con un paddock esterno alla stalla.

Il management degli animali varia da realtà molto essenziali sotto tutti i punti di vista ad aziende con destagionalizzazione dei parti, divisione degli animali in categorie e alimentazione differenziata.

I capretti vengono venduti per la carne nei periodi con richiesta sul mercato, altrimenti usati come rimonta interna.

5.2 Campionamento

Il campionamento è avvenuto tra ottobre 2021 e gennaio 2022; è stata data precedenza ad aziende per cui era stata segnalata dai medici veterinari aziendali una presunta riduzione dell'efficacia dei trattamenti antielmintici che venivano effettuati.

Sono stati stabiliti i seguenti criteri di inclusione:

- Non doveva essere stato effettuato un trattamento nei 3 mesi precedenti al campionamento.
- Presenza di fattori quali l'uso del pascolo e/o la presenza di paddock esterno che aumentano la probabilità di avere un'elevata carica parassitaria media.

Sono state selezionate 6 aziende che rispondevano ai criteri di inclusione sopra elencati.

Per la valutazione dell'efficacia del trattamento è stato effettuato un FECRT. Nelle aziende oggetto di campionamento vengono usati solo benzimidazolici e lattoni macrociclici, quindi si è deciso di distanziare il primo e secondo campionamento di un tempo fisso di 14 giorni per soddisfare i requisiti temporali tra i due campionamenti di entrambi i gruppi di molecole, come da protocollo COMBAR.

I campioni fecali sono stati prelevati direttamente dal retto, conservati in provette identificate con un numero progressivo associato al numero di marca auricolare dell'individuo.

Per ogni azienda si è scelto di campionare un determinato numero di animali basandosi sulla numerosità totale dei capi e applicando il criterio derivante dalla ricerca di Maurizio et al., 2021 per determinare la numerosità campionaria. Per il secondo campionamento sono stati selezionati i 10 animali con la FEC più elevata calcolata dal primo campionamento.

Gli individui sono stati prelevati in modo casuale ma rappresentativo delle categorie manageriali presenti in allevamento, escludendo animali con meno di un anno di età in quanto gestiti diversamente (tenuti esclusivamente in stalla) rispetto al gregge adulto.

I campioni sono stati trasportati e conservati a temperatura di refrigerazione in attesa delle analisi laboratoriali.



Figura 6: operazioni di raccolta delle feci con animali in cattura

Per ogni azienda sono state poste delle domande all'allevatore o al veterinario aziendale riguardo il management degli animali e le pratiche di controllo degli endoparassiti, con particolare riferimento all'utilizzo degli antelmintici. In particolare, è stato chiesto se gli animali avessero accesso al pascolo, il numero di trattamenti annuali, i principi attivi antelmintici utilizzati comunemente, il dosaggio del farmaco, come viene stimato il peso, se e come viene monitorato il carico parassitario nella popolazione. In alcune aziende è stata effettuata la pesa di alcuni capi per confrontarla con la stima ipotizzata da allevatore o veterinario aziendale. Infine, è stata presa nota delle razze presenti in allevamento e del farmaco utilizzato nel trattamento effettuato contestualmente al primo campionamento.

5.3 Analisi di laboratorio individuali

Dopo il primo prelievo, per ogni campione ottenuto è stato eseguito un esame copromicroscopico quantitativo con metodo di McMaster modificato: per ogni campione vengono stemperati 5g di feci (2g quando il quantitativo è insufficiente) con soluzione ad alto peso specifico (1,300). La sospensione viene travasata in una provetta Falcon e la stessa soluzione viene aggiunta fino a raggiungere un volume di 30ml. La provetta viene agitata delicatamente e poi viene prelevato con una pipetta un quantitativo sufficiente di sospensione, utilizzando delle garze come filtro per il materiale grossolano. La pipetta viene poi impiegata per riempire le due camere di McMaster. Si attendono 2-3 minuti per permettere la flottazione degli elementi parassitari e si osserva al microscopio ottico. Una volta contate le uova/oocisti, il numero ottenuto va moltiplicato per 20 (per 50 se si è partiti da 2g di feci) per ottenere il valore di upg.

Questo esame ha permesso di calcolare la FEC pretrattamento di ogni animale ottenendo un dato di uova per grammo (upg) di feci individuale. Inoltre, è stato possibile effettuare contestualmente una prima identificazione dei generi di nematodi gastrointestinali distinguibili in base alle forme riproduttive.

Sono state individuate e contate le uova di strongili gastrointestinali (SGI), cestodi, *Trichuris*, *Capillaria* e *Skrjabinema*; per gli SGI sono state contate separatamente le uova di *Strongyloides* e *Nematodirus/Marshallagia* che sono differenziabili morfologicamente. Per le oocisti di coccidi è stata considerata solo la positività/negatività.

Per il secondo campionamento è stata eseguita la stessa analisi sui 10 animali con la FEC più elevata risultante dal primo campionamento, permettendo di ottenere un dato di upg di feci post-trattamento per questi animali.

Queste analisi sono state eseguite nell'arco di 2-3 giorni dopo ogni campionamento.

5.4 Analisi di laboratorio su pool

Una volta selezionati i 10 capi maggiormente parassitati, sono stati creati due pool da 5 individui con un'aliquota di 6g di feci per ogni individuo, dividendo i campioni individuali omogeneamente in due gruppi. I pool di feci sono stati processati mediante mini-Baermann per la ricerca delle larve di primo stadio (L1) dei nematodi broncopulmonari. Per questa tecnica viene avvolto un quantitativo adeguato (circa 4 grammi) di feci in un doppio strato di garza e poi viene inserito in una provetta Falcon con un volume di acqua sufficiente da permettere la completa sospensione delle feci. In 16-24h le larve migrano nell'acqua per il loro igrotropismo e quindi sul fondo della provetta. Questo sedimento viene prelevato tramite pipetta ed osservato allo stereomicroscopio; da qui vengono prelevate le larve tramite una pipetta Pasteur di vetro e trasferite su un vetrino portaoggetti che viene osservato al microscopio ottico per l'identificazione. Sono quindi state contate e identificate almeno 10 larve di nematodi broncopulmonari, classificandole in generi secondo la classificazione di van Wyk & Mayhew, 2013.



Figura 7: allestimento di coproculture

Successivamente per entrambi i pool è stata allestita una coprocultura. Dopo un'incubazione di 7 giorni a 26°C con aggiunta quotidiana di acqua minerale per il mantenimento dell'umidità delle feci, sono state isolate le larve L3 tramite la tecnica mini-Baermann.



Figura 8: esempio di larve L3 visibili al microscopio ottico; in questo caso classificabili come morfotipo M3

Sono state poi identificate 50 larve per ogni pool tramite parametri morfometrici al microscopio ottico. Come da procedura diagnostica di identificazione del Laboratorio di parassitologia dell'Università di Padova e a causa delle difficoltà che si riscontrano nella differenziazione certa di alcuni generi, le L3 visualizzate sono state classificate in 4 morfotipi attribuibili ai seguenti

generi: *Haemonchus* (M1),
Trichostrongylus/Teladorsagia

(M2), *Oesophagostomum/Chabertia* (M3), *Bunostomum/Gaigeria* (M4), adattando le chiavi di riconoscimento morfologico di van Wyk & Mayhew (2013), come effettuato in precedenza da Carcereri et al., 2021.

Quando le larve non erano presenti in numero sufficiente (di frequente nei pool post trattamento), sono state contate tutte le larve presenti.

Inoltre, sui pool è stato anche svolto un esame copromicroscopico qualitativo tramite la tecnica di sedimentazione e flottazione; questa tecnica consiste nel trasferire in un mortaio le feci, che vengono stemperate con l'aggiunta di circa 10mL di acqua fino ad omogenizzare la soluzione. Questa viene filtrata attraverso un colino in una provetta da centrifuga riempiendola quasi completamente. La provetta viene centrifugata a 1500rpm per 4 minuti. Successivamente viene versato il surnatante e viene aggiunto al sedimento una soluzione ad alto peso specifico, in questo caso una soluzione 1,500, idonea anche per la ricerca di eventuali trematodi. La provetta viene centrifugata con gli stessi parametri del passaggio precedente e viene poi messa in un porta-provette. Si colma con la soluzione ad alto peso specifico la provetta fino a formare un menisco leggermente positivo, sul quale viene appoggiato un vetrino copri-oggetti. Dopo 2-3 minuti si rimuove il vetrino copri-oggetti e lo si appoggia sul vetrino porta-oggetti. A questo punto è possibile osservarlo al microscopio ottico.

5.5 Calcolo della FECR% e interpretazione del dato

Il calcolo della FECR% e del relativo intervallo di confidenza al 95% (IC95) è stato effettuato su software Microsoft Excel mediante le seguenti formule, come indicato da Dobson et al. (2012):

$$FECR = 100 \times \left(1 - \frac{FEC_{post}}{FEC_{pre}}\right)$$

$$(1 - \alpha)\%liIC = 100 \times \left\{1 - \left[INV.BETA.N\left(1 - \frac{\alpha}{2}, x + 1, n - x + 1\right)\right]\right\}$$

$$(1 - \alpha)\%lsIC = 100 \times \left\{1 - \left[INV.BETA.N\left(\frac{\alpha}{2}, x + 1, n - x + 1\right)\right]\right\}$$

dove:

- FECpre = media delle upg pre trattamento;
- FECpost = media delle upg post trattamento;
- liIC = limite inferiore dell'IC95;
- lsIC = limite superiore dell'IC95;
- α = livello di significatività;
- n = totale uova contate pre trattamento;
- x = totale uova contate post trattamento.

Le stesse formule sono state anche impiegate per il calcolo della FECR genere-specifica.

Secondo il protocollo COMBAR, che si basa sul lavoro di Coles et al., 1992, la FECR% che si ottiene è da valutare secondo una classificazione in 3 categorie:

- Ridotta efficacia: $FECR < 95\%$ e limite inferiore dell'IC95 $< 90\%$
- Efficacia dubbia: $FECR < 95\%$ oppure limite inferiore dell'IC95 $< 90\%$
- Efficacia normale: $FECR \geq 95\%$ e limite inferiore dell'IC95 $\geq 90\%$

6. RISULTATI

6.1 Monitoraggio aziendale

Dal sondaggio aziendale è emersa una gestione degli animali variabile; in alcune aziende c'è una suddivisione in categorie con separazione di individui con meno di un anno di età e maschi ma nella maggior parte c'è promiscuità dei capi. Le aziende H e Z condividono gli stessi spazi al pascolo quindi, di fatto, gli animali convivono per una parte dell'anno.

Gli animali delle aziende B, G e M hanno sempre libero accesso a un pascolo esterno alla stalla di limitate dimensioni (d'ora in poi definito "pascolo fisso"), mentre quelli delle altre aziende vengono portati in diversi pascoli (d'ora in poi definito "pascolo mobile") compatibilmente con il periodo dell'anno e le condizioni climatiche; H, Z e B sfruttano pascoli alpini. Una particolarità gestionale riguarda l'azienda M che divide le capre in produzione in due gruppi a lattazione lunga; i parti sono ad anni alterni tra i due gruppi e quindi la lattazione dura circa 2 anni.

Per quanto riguarda i trattamenti antielmintici, le aziende considerate fanno 1 o 2 trattamenti all'anno sfruttando nel periodo autunnale/invernale l'asciutta dei capi per aggirare il problema dei tempi di sospensione del farmaco. Le molecole utilizzate sono del gruppo dei benzimidazolici o dei lattoni macrociclici, solitamente vengono alternate tra i diversi trattamenti e non usate in associazione. Il dosaggio viene raddoppiato rispetto al foglietto illustrativo tranne nell'azienda A, e basato sull'animale più pesante o su classi di peso. La stima di peso avviene su base visiva; la pesa effettuata nelle aziende B, H e Z ha evidenziato fundamentalmente una similarità o una leggera sottostima del veterinario aziendale rispetto al peso reale

Il monitoraggio quali-quantitativo del carico parassitario è saltuario in tutte le aziende analizzate e non entra a far parte di un processo decisionale sulla frequenza, sul periodo o sulla selezione di animali a cui somministrare il trattamento antielmintico.

In *tabella 3* vengono schematizzati i dati manageriali ottenuti dal monitoraggio aziendale:

ID az	N	Razza	Tipo di pascolo	Trattamento				Monitoraggio animali
				n/anno	Principi attivi usati	Dosaggio	Stima peso	
A	35	Camosciata	Pascolo mobile	1	BZ e LM	Non raddoppiato. Dosaggio per classi di peso	Stima visiva	Clinico, esame copro-microscopico solo in caso di sintomatologia
B	22	Passiria	Pascolo fisso	1 o 2	BZ e LM	Raddoppiato. Dosaggio per classi di peso	Stima visiva, correttezza verificata con pesa animali	Esame copro-microscopico qualitativo
G	45	Camosciata	Pascolo fisso	1	BZ e LM	Raddoppiato. Dosaggio per classi di peso	Stima visiva, in passato effettuate pesate a conferma	Clinico regolare, esame copro-microscopico non regolare
H	27	Passiria	Pascolo mobile	1 o 2	BZ e LM	Raddoppiato	Stima visiva, correttezza verificata con pesa animali	Esame copro-microscopico qualitativo
M	200	Camosciata Saanen meticcias	Pascolo fisso	2	BZ e LM	Raddoppiato. Dosaggio per classi di peso	Stima visiva	Esame copro-microscopico ogni 2 anni
Z	41	Passiria	Pascolo mobile	1 o 2	BZ e LM	Raddoppiato	Stima visiva, correttezza verificata con pesa animali	Esame copro-microscopico qualitativo

Tabella 3: schematizzazione dati del monitoraggio aziendale. N= dimensione aziendale.

Il primo campionamento e le analisi effettuate successivamente hanno avuto una valenza di monitoraggio epidemiologico dei parassiti presenti in stalla. In *tabella 4* sono presenti i risultati ottenuti dalle analisi individuali quantitative; viene riportato il

dato medio di upg di SGI per i capi analizzati e inoltre un dato di prevalenza per altri parassiti quali: coccidi (Coc), *Trichuris* (Trich), *Nematodirus/Marshallagia* (N/M), *Skrjabinema* (Skr), cestodi (Cest) e *Strongyloides* (Stro), per i quali la carica in termini di upg è sempre risultata molto bassa.

ID az	N	UPG media	SGI%	Coc%	Trich%	Nem/Mar%	Skr%	Cest%	Stro%
A	14	1009,3	92,9	100,0	7,7	0,0	0,0	0,0	7,7
B	12	442,5	91,7	41,7	16,7	0,0	0,0	0,0	0,0
G	16	2210,0	100,0	93,8	25,0	0,0	0,0	0,0	18,8
H	14	270,7	85,7	66,7	20,0	0,0	0,0	26,7	0,0
M	22	2362,7	100,0	95,5	13,6	0,0	36,4	0	50,0
Z	19	440,0	100,0	94,7	5,3	5,3	5,3	10,5	5,3

Tabella 4: riassunto dei risultati ottenuti dall'analisi quantitativa individuale nel primo campionamento. L'upg media è relativa esclusivamente alle uova di SGI, mentre i valori con la % indicano la prevalenza del relativo parassita tra i campioni analizzati. N= numero animali testati. Strongili gastrointestinali = SGI, Coccidi = Coc, Trichuris = Trich, Nematodirus/Marshallagia = N/M, Skrjabinema = Skr, cestodi = Cest, Strongyloides = Stro.

Successivamente è stata effettuata la coprocoltura dei pool e l'identificazione delle larve sviluppatesi. Per ogni pool sono state identificate 50 larve nei 4 morfotipi sopra descritti. Il dato più interessante ottenuto da questa analisi è la prevalenza relativa di ogni morfotipo all'interno delle aziende, che viene riportato in *tabella 5*:

ID az	M1%	M2%	M3%	M4%
A	19	51	30	0
B	12	9	79	0
G	86	0	14	0
H	58	25	17	0
M	34	56	10	0
Z	80	15	5	0

Tabella 5: prevalenza in % di ogni morfotipo per azienda. Si ricorda che M1: Haemonchus; M2: Trichostrongylus/Teladorsagia; M3: Oesophagostomum/Chabertia; M4: Bunostomum/Gaigeria.

Si può notare che non sono state individuate larve classificabili come morfotipo 4; per questo motivo non sarà più riportato nelle tabelle successive.

6.2 Efficacia del trattamento

Il secondo campionamento e le seguenti analisi hanno conferito dei risultati che, confrontati con quelli pre trattamento, hanno permesso di valutare l'efficacia del trattamento stesso.

In *tabella 6* sono presenti i risultati relativi a: upg media pre trattamento (includendo nel calcolo solo i capi che sono stati selezionati per il secondo campionamento), upg media post-trattamento, il calcolo della FECR% e dei dati relativi al trattamento farmacologico nello specifico. Sono stati soggetti al secondo campionamento i 10 capi con il dato di upg maggiore risultante dalle analisi del primo

campionamento. Nell'azienda H non è stato possibile campionare uno dei 10 capi selezionati in quanto non più presente in azienda, quindi i valori medi sono relativi ai 9 capi con maggior valore di upg nel primo campionamento.

ID az	upg media pre	upg media post	FECR% (IC%)	Farmaco (principio attivo)	Classe farmaco	Dosaggio	Via di somministrazione
A	1226,0	14,0	98,9 (97,7-99,4)	Panacur (fenbendazolo)	BZ	non raddoppiato	OS
B	519,0	113,0	78,2 (72,8-82,8)	Sverminator (albendazolo)	BZ	raddoppiato	OS
G	3200,0	0,0	100,0 (99,8-100,0)	Contruerme (albendazolo)	BZ	raddoppiato	OS
H	384,4	35,6	90,8 (85,5-94,2)	Ivomec plus (ivermectina)	LM	raddoppiato	SC
M	4772,0	388,0	91,9 (90,7-92,9)	Oxfenil (oxfendazolo)	BZ	raddoppiato	OS
Z	524,0	0,0	100,0 (98,6-100,0)	Ivomec plus (ivermectina)	LM	raddoppiato	SC

Tabella 6: riassunto dati ottenuti dall'analisi quantitativa individuale post-trattamento con il valore medio di upg e il confronto con lo stesso valore relativo al pre trattamento; inoltre sono presenti dei dati specifici del trattamento farmacologico effettuato. L'intervallo di confidenza della FECR% è riportato tra parentesi sotto il valore stesso. BZ = benzimidazolico, LM = lattone macrociclico. OS = via orale, SC = via sottocutanea.

Si può notare già dal valore di upg media post-trattamento la variabilità dell'efficacia del trattamento tra le diverse aziende.

In base ai parametri di interpretazione della FECR riportati al capitolo 2.2.4 possiamo affermare che nelle aziende B e H c'è stata una ridotta efficacia del trattamento antielmintico, nell'azienda M il trattamento è risultato avere un'efficacia dubbia. Nelle aziende A, G e Z, invece, il trattamento è risultato efficace.

Dopo l'analisi quantitativa individuale si è proceduto di nuovo con l'analisi dei pool con coprocultura e identificazione delle larve secondo i 4 morfotipi (solo 3 presenti in tabella perché non è stata riscontrata nessuna larva catalogabile come M4).

Vengono riportate in *tabella 7* le prevalenze relative dei diversi morfotipi risultanti dalle analisi post-trattamento confrontate con le prevalenze, già mostrate, del pre-trattamento. La FECR% dei morfotipi è stata ricavata applicando le percentuali dei morfotipi all'upg; in questo modo, combinando il valore complessivo di upg e il valore percentuale di larve dei singoli morfotipi, è stato stimato il numero di uova riconducibili ai relativi morfotipi. Sono stati confrontati il numero di uova pre e post trattamento appartenenti a ogni morfotipo e quindi calcolata la FECR% per ognuno di essi.

ID az	Morfotipo	UPG stimata pre	% pre	UPG stimata post	% post	FECR% (IC%)
A	M1	232,9	19,0	5,2	37,0	97,8 (93,3-99,2)
	M2	625,3	51,0	1,1	8,0	99,8 (98,5-100)
	M3	367,8	30,0	7,8	56,0	97,9 (94,6-99,1)
B	M1	62,3	12,0	100,6	89,0	-61,0 (*)
	M2	46,7	9,0	12,4	11,0	72,7 (52,2-86,5)
	M3	410,0	79,0	0,0	0,0	100,0 (98,2-100)
G	M1	2752,0	86,0	0,0	0,0	100,0 (99,7-100)
	M2	0,0	0,0	0,0	0,0	* (*)
	M3	448,0	14,0	0,0	0,0	100,0 (98,4-100)
H	M1	223,0	58,0	28,1	79,0	87,5 (79,5-92,5)
	M2	96,1	25,0	7,5	21,0	92,1 (80,2-97)
	M3	63,3	17,0	0,0	0,0	100,0 (88,6-99,9)
M	M1	1622,5	34,0	360,8	93,0	77,7 (74,7-80,4)
	M2	2672,3	56,0	27,2	7,0	99,0 (98,4-99,4)
	M3	477,2	10,0	0,0	0,0	100,0 (98,5-100)
Z	M1	419,2	80,0	0,0	0,0	100,0 (98,3-100)
	M2	78,6	15,0	0,0	0,0	100,0 (92,9-100)
	M3	26,2	5,0	0,0	0,0	100,0 (95,9-100)

Tabella 7: dati della prevalenza relativa di ogni morfotipo pre e post trattamento, della FECR% e dell'intervallo di confidenza riportato tra parentesi. *= non calcolabile.

Si può notare come, soprattutto nelle aziende in cui è stata riscontrata una ridotta efficacia del trattamento, ci sia una non omogenea efficacia del trattamento tra i diversi morfotipi, e in particolare il genere *Haemonchus* (M1), che mostra la minor riduzione nella FEC post trattamento.

DISCUSSIONE

Dai dati manageriali raccolti dalle aziende prese in esame, emerge un numero esiguo di trattamenti antelmintici annuali (1 o 2) per tutti e 6 gli allevamenti; questa situazione è tipica in Italia, dove la frequenza di trattamento è inferiore rispetto agli altri Paesi europei dove si arriva anche a 4 o 6 trattamenti annuali (Lambertz et al., 2019; Maurizio et al., 2021; Zanzani et al., 2014). Per quanto questa caratteristica gestionale sia stata probabilmente un fattore ritardante la diffusione di resistenza nel nostro Paese negli scorsi decenni, è dimostrato non essere più sufficiente al controllo della stessa (Rose Vineer et al., 2020).

Il dosaggio del farmaco viene sistematicamente raddoppiato rispetto alla posologia per gli ovini (che hanno un più lento metabolismo degli xenobiotici) riportata nel foglietto illustrativo per evitare un sottodosaggio. Nell'azienda A viene invece usato il dosaggio riportato per gli ovini.

Il monitoraggio parassitologico che viene solitamente compiuto dalle aziende esaminate non è indicativo della situazione parassitaria del gruppo né utile per la valutazione dell'efficacia dei trattamenti farmacologici. Viene impiegato un monitoraggio dei segni clinici, che abbiamo detto essere troppo tardivo per poter controllare efficacemente le parassitosi in stalla; qualcuno si serve di esami copromicroscopici qualitativi, che danno un'idea dell'epidemiologia di stalla ma non del carico parassitario. Infine, alcuni allevatori si servono di esami copromicroscopici quantitativi in capi con sintomatologia clinica, quindi troppo tardi per poter prevenire le perdite legate all'infestazione, oppure con frequenze troppo basse per consentire un monitoraggio parassitologico significativo.

Inoltre, l'efficacia del trattamento farmacologico non viene mai verificata tramite esami di laboratorio. Come descritto in introduzione, la farmacoresistenza, se non tenuta monitorata, può passare in un breve periodo di tempo da macroscopicamente impercettibile a clinicamente rilevante e difficilmente contrastabile.

Da queste informazioni raccolte si può dedurre come nelle aziende in esame il trattamento venga effettuato a tappeto su tutti i capi empiricamente nel periodo più congeniale all'allevatore, in particolare alla messa in asciutta per evitare i tempi di

sospensione del latte; questa pratica trova una motivazione anche nel fatto che c'è un solo farmaco (Eprinex, a base di eprinomectina) impiegabile in lattazione senza tempi di sospensione. In aggiunta alle difficoltà manageriali ci sono anche dei limiti oggettivi nel controllo degli elminti nella capra, come il ridotto numero di farmaci registrati anche rispetto agli ovini che non consentono di variare molto le molecole utilizzate e i dosaggi riportati in foglietto illustrativo, che non sono specifici per la capra, specie che viene accorpata alla pecora. Il trattamento risulta quindi scollegato da diagnosi e non basato sui principi che permettono la conservazione del *refugia*. Questo utilizzo poco responsabile del farmaco rende l'insorgenza di resistenza più probabile, più rapida e meno controllata.

Per quanto riguarda l'indagine epidemiologica, la carica parassitaria espressa in upg degli SGI è risultata in linea con altri studi effettuati nella stessa area geografica (Lambertz et al., 2019; Maurizio et al., 2021; Zanzani et al., 2014) e con il management degli allevamenti presi in esame. Si può notare come gli allevamenti che mettono a disposizione dei loro capi un pascolo fisso esterno alla stalla abbiano una upg media per gli SGI maggiore degli altri; un pascolo continuamente frequentato, infatti, porta a un maggiore carico parassitario del pascolo stesso e quindi maggiore probabilità di reinfestarsi per gli animali che lo frequentano.

Per quanto riguarda i coccidi si nota una prevalenza molto alta ma, come già descritto, è la norma negli allevamenti caprini italiani ed europei in generale (Zanzani et al., 2014). Per gli altri parassiti ricercati (*Trichuris*, *Nematodirus/Marshallagia*, *Skrjabinema*, cestodi e *Strongyloides*) si può notare una discreta eterogeneità di popolazione, ma sempre con prevalenza e abbondanza limitate. Per questo motivo per il calcolo della FECR vengono conteggiate solo le uova di SGI.

Dall'identificazione delle larve schiuse dalle uova di SGI dei campioni pre trattamento è emersa una discreta eterogeneità dei morfotipi presenti, tranne per M4 che è risultato assente. Questo risultato è compatibile con la distribuzione geografica di *Gaigeria* e *Bunostomum* (classificabili morfologicamente come M4) che generalmente prediligono zone con clima tropicale o subtropicale, mentre in zone con

clima temperato, come il nostro, si possono trovare ma con prevalenza limitata (Taylor et al., 2015).

Con l'analisi quantitativa dei campioni post trattamento è stato possibile confrontare l'upg media post con quella pre trattamento, per valutare l'efficacia del trattamento stesso. Il dato fondamentale che si evidenzia da questa analisi è che due aziende (B e H) ha manifestato una ridotta efficacia del trattamento farmacologico mentre in una (M) l'efficacia del trattamento è risultata dubbia. Questo dato è confrontabile con il risultato della ricerca di Lambertz et al. (2019) che ha trovato ridotta efficacia del trattamento in 2 aziende su 5 testate ed efficacia dubbia in un'altra, per determinate molecole. Questi risultati suggeriscono il trend di crescente prevalenza di resistenza tra gli allevamenti caprini in Italia. L'antelmintico resistenza nel nostro Paese è sempre risultata contenuta e fino a qualche anno fa erano rare le segnalazioni in letteratura (Cringoli et al., 2007; Geurden et al., 2014; Traversa et al., 2007; Zanzani et al., 2014), ma ormai ha iniziato a diffondersi a livelli preoccupanti. Lo scarso ricorso al trattamento farmacologico ha contribuito a posticipare l'insorgenza di resistenza in Italia rispetto agli altri Paesi. Le pratiche comuni, tuttavia, non sono più efficaci nella conservazione dell'efficacia del farmaco, per la quale si rende necessario un programma di monitoraggio copromicroscopico mirato all'organizzazione di una strategia dei trattamenti basata sulle linee guida citate nel capitolo 1.3; inoltre sarebbe indicato verificare l'efficacia di ogni trattamento.

Da notare il fatto che l'azienda H e l'azienda Z, come scritto precedentemente, condividono il pascolo nei mesi estivi e i capi convivono tra di loro. Tuttavia, l'efficacia del trattamento è risultata nettamente diversa tra le due aziende; nell'azienda Z la FECR% è risultata del 100% mentre nella H del 90,8%. Questa differenza potrebbe essere attribuibile alla diversa gestione degli animali e dei trattamenti nella stagione invernale ma è altrettanto plausibile che si tratti solo di un riscontro casuale, a conferma del fatto che il risultato di una singola FECRT non sia di per sé indicativo di effettiva presenza di resistenza.

L'identificazione larvale dopo coprocoltura è un altro passaggio fondamentale e innovativo di questo progetto. Infatti, il solo calcolo dell'efficacia del trattamento

tramite FECRT applicato all'upg non ci consente di conoscere le differenze tra i vari generi nel rispondere al farmaco. Inoltre, l'identificazione delle larve e il calcolo della prevalenza relativa dà un quadro della diffusione della resistenza nella popolazione parassitaria: più generi risultano non suscettibili e più molecole dimostrano una diminuzione di efficacia, più la situazione è difficilmente gestibile. L'identificazione larvale e la comparazione della prevalenza relativa dei diversi generi (nel nostro caso morfotipi) tra i campioni pre e post trattamento, è stata effettuata solo negli studi di Voigt et al. (2022) e di Salgado et al. (2019).

Da questa analisi si può notare come, soprattutto nelle aziende in cui il trattamento ha avuto una scarsa o dubbia efficacia (B, H e M), la FECR% del M1 è risultata la più bassa e quindi il trattamento è stato particolarmente poco efficace nei confronti di questo morfotipo. La prevalenza di M1 nei campioni post trattamento in queste aziende si è affermata su valori decisamente alti, tra il 79 e il 93%. Questo dato era prevedibile in quanto, come descritto precedentemente, il genere *Haemonchus*, tra gli SGI, è quello più soggetto e rapido a sviluppare resistenza.

La scarsa efficacia di un trattamento può avere molte cause; la resistenza è una di queste ma esistono parecchi fattori confondenti nella valutazione del FECRT (Morgan et al., 2022). Nella nostra esperienza in questo studio, per esempio, abbiamo notato che al momento del trattamento per via orale non sempre, se non su sollecito, l'allevatore si accertava del fatto che il farmaco venisse completamente ingerito dall'animale. Questo, come altri fattori presenti in *figura 9*, può determinare una riduzione dell'efficacia del trattamento riconducibile a sottodosaggio, e non direttamente a resistenza; tuttavia, pratiche come queste, costituiscono un fattore accelerante lo sviluppo di resistenza.

L'analisi dei morfotipi ci ha permesso anche di poter affermare con maggiore sicurezza la presenza di generi resistenti negli allevamenti B, H e, probabilmente, M. Infatti, un fallimento del trattamento per fattori diversi dalla presenza di antielmintico resistenza comporterebbe una variazione tra le prevalenze relative dei morfotipi pre e post trattamento molto più contenuta rispetto a quella riscontrata in questo studio, che

ha visto invece la netta predominanza del genere *Haemonchus* tra le larve identificate dopo il trattamento.

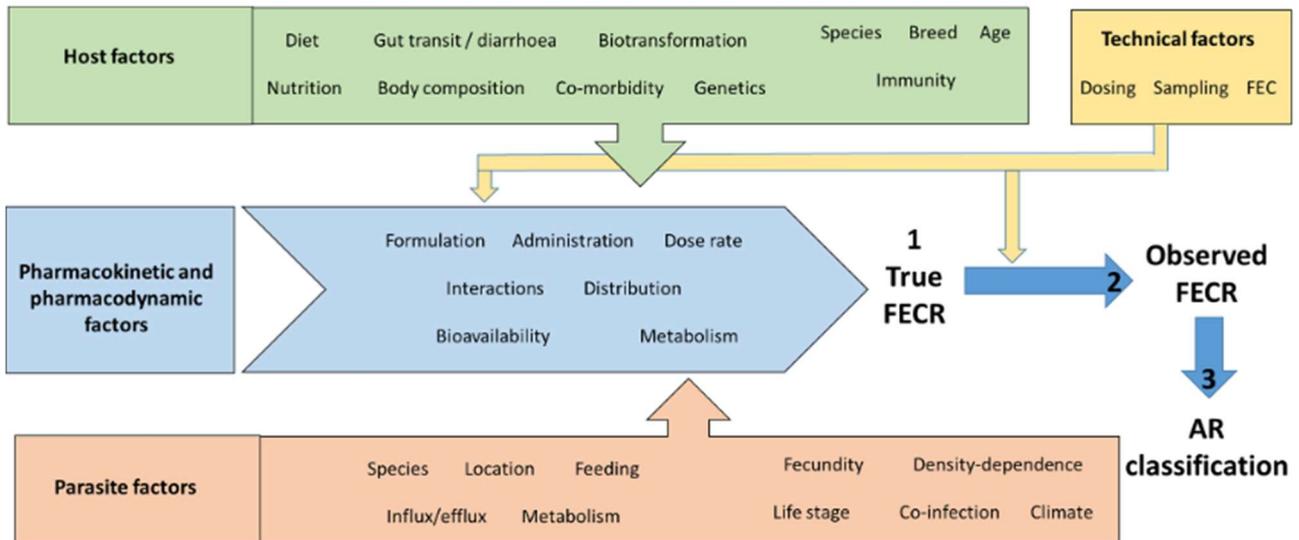


Figura 9: tratta da Morgan et al. (2022), mostra i fattori confondenti da tenere in considerazione nello study design, nella conduzione dello studio e nell'interpretazione della FECR. Questi fattori possono essere ascrivibili all'ospite, alla farmacocinetica e farmacodinamica e al parassita; i fattori tecnici influenzano sia l'assorbimento del farmaco che il calcolo della FECR durante l'analisi delle feci.

L'analisi biomolecolare tramite PCR delle larve isolate dai campioni post trattamento sarebbe dirimente in quanto la presenza di geni di resistenza nel genoma dei parassiti confermerebbe l'ipotesi di antelmintico resistenza.

Ciò che emerge da questa indagine è uno scenario a rischio elevato di insorgenza e diffusione di antelmintico resistenza, una minaccia molto seria per il benessere animale e un importante danno economico per le aziende. L'utilizzo dell'identificazione delle larve ci ha permesso non solo di avere una prova in più che la ridotta efficacia del trattamento sia legata a resistenza, ma anche di ipotizzare che questa resistenza possa essere, per il momento, limitata al genere *Haemonchus*.

Questo lavoro contribuisce a creare una maggiore conoscenza della diffusione del problema dell'antelmintico resistenza, la cui potenziale gravità non è ancora stata pienamente compresa, ponendo le basi scientifiche per una maggiore sensibilizzazione

di allevatori e medici veterinari. Operando un monitoraggio del carico parassitario più strutturato e frequente si può intervenire in prevenzione organizzando una strategia di trattamento basata sul *refugia*. Ridurre la pressione selettiva per i parassiti resistenti tramite pratiche sostenibili di controllo degli stessi dovrebbe essere un obiettivo primario nel trattamento antielmintico. Inoltre, sarebbe bene inserire un FECRT, come quello condotto da noi in questa indagine, nell'iter diagnostico in azienda quando viene sospettata la presenza di parassiti resistenti, in modo da poter agire tempestivamente.

BIBLIOGRAFIA

- Abongwa, M., Martin, R. J., & Robertson, A. P. (2017). A brief review on the mode of action of antinematodal drugs. In *Acta Veterinaria* (Vol. 67, Issue 2, pp. 137–152). Walter de Gruyter GmbH. <https://doi.org/10.1515/acve-2017-0013>
- Bangoura, B., & Bardsley, K. D. (2020). Ruminant Coccidiosis. In *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* (Vol. 36, Issue 1, pp. 187–203). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2019.12.006>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2009.09.009>
- Battaglini LM. (2007). *Sistemi ovicaprini nelle Alpi occidentali: realtà e prospettive*.
- Besier, R. B. (2012). Refugia-based strategies for sustainable worm control: Factors affecting the acceptability to sheep and goat owners. *Veterinary Parasitology*, 186(1–2), 2–9. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.11.057>
- Carcereri, A., Stancampiano, L., Marchiori, E., Sturaro, E., Ramanzin, M., & Cassini, R. (2021). Factors influencing gastrointestinal parasites in a colony of alpine ibex (*Capra ibex*) interacting with domestic ruminants. *Hystrix*, 32(1), 95–101. <https://doi.org/10.4404/hystrix-00393-2020>
- Carli, Ormas, Re, & Soldani. (2008). *Farmacologia veterinaria*.
- Charlier, J., Morgan, E. R., Rinaldi, L., van Dijk, J., Demeler, J., Höglund, J., Hertzberg, H., van Ranst, B., Hendrickx, G., Vercruyse, J., & Kenyon, F. (2014). Practices to optimise gastrointestinal nematode control on sheep, goat and cattle farms in Europe using targeted (selective) treatments. In *Veterinary Record* (Vol. 175, Issue 10, pp. 250–255). British Veterinary Association. <https://doi.org/10.1136/vr.102512>
- Charlier, J., Rinaldi, L., Musella, V., Ploeger, H. W., Chartier, C., Vineer, H. R., Hinney, B., von Samson-Himmelstjerna, G., Băcescu, B., Mickiewicz, M., Mateus, T. L., Martínez-Valladares, M., Quealy, S., Azaizeh, H., Sekovska, B., Akkari, H., Petkevicius, S., Hektoen, L., Höglund, J., ... Claerebout, E. (2020). Initial assessment of the economic burden of major parasitic helminth infections to the ruminant livestock industry in Europe. *Preventive Veterinary Medicine*, 182. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.105103>
- Chartier, C., Etter, E., Hoste, H., Pors, I., Mallereau, M. P., Broqua, C., Mallet, S., Koch, C., & Massé, A. (2000). Effects of the initial level of milk production and of the dietary protein intake on the course of natural nematode infection in dairy goats. *Veterinary Parasitology*, 92(1), 1–13. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(00\)00268-5](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(00)00268-5)

- Chartier, C., Hoste, H., Bouquet, W., Malpaux, B., Pors, I., & Koch, C. (1998). *Periparturient rise in fecal egg counts associated with prolactin concentration increase in French Alpine dairy goats.*
- Chartier, C., & Paraud, C. (2012). Coccidiosis due to *Eimeria* in sheep and goats, a review. *Small Ruminant Research*, *103*(1), 84–92.
<https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2011.10.022>
- Coles, G. C., Bauer, C., Borgsteede, F. H. M., Geerts, S., Klei, T. R., Taylor, M. A., Waller, P. J., Borgsteede, C., Geerts, F. H. M., Klei, S., Taylor, T. R., & Waller, M. A. (1992). World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. In *Veterinary Parasitology* (Vol. 44).
- Coles, G. C., Jackson, F., Pomroy, W. E., Prichard, R. K., von Samson-Himmelstjerna, G., Silvestre, A., Taylor, M. A., & Vercruyse, J. (2006). The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. In *Veterinary Parasitology* (Vol. 136, Issues 3–4, pp. 167–185).
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.11.019>
- Constable, P., Hinchcliff, K. W., Done, S., & Gruenberg, W. (2017). *Veterinary Medicine, 11th edition.*
- Cringoli, G., Veneziano, V., Rinaldi, L., Sauv e, C., Rubino, R., Fedele, V., & Cabaret, J. (2007). Resistance of trichostrongyles to benzimidazoles in Italy: A first report in a goat farm with multiple and repeated introductions. *Parasitology Research*, *101*(3), 577–581. <https://doi.org/10.1007/s00436-007-0518-7>
- Dobson, R. J., Hosking, B. C., Jacobson, C. L., Cotter, J. L., Besier, R. B., Stein, P. A., & Reid, S. A. (2012). Preserving new anthelmintics: A simple method for estimating faecal egg count reduction test (FECRT) confidence limits when efficacy and/or nematode aggregation is high. *Veterinary Parasitology*, *186*(1–2), 79–92.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.11.049>
- Escare o, L., Salinas-Gonzalez, H., Wurzinger, M., I iguez, L., S lkner, J., & Meza-Herrera, C. (2012). Dairy goat production systems: Status quo, perspectives and challenges. In *Tropical Animal Health and Production* (Vol. 45, Issue 1, pp. 17–34). Springer. <https://doi.org/10.1007/s11250-012-0246-6>
- Fthenakis, G. C., & Papadopoulos, E. (2018). Impact of parasitism in goat production. *Small Ruminant Research*, *163*, 21–23.
<https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2017.04.001>
- Geurden, T., Hoste, H., Jacquiet, P., Traversa, D., Sotiraki, S., Frangipane di Regalbono, A., Tzanidakis, N., Kostopoulou, D., Gaillac, C., Privat, S., Giangaspero, A., Zanardello, C., No e, L., Vanimisetti, B., & Bartram, D. (2014). Anthelmintic resistance and multidrug resistance in sheep gastro-intestinal nematodes in France, Greece and Italy. *Veterinary Parasitology*, *201*(1–2), 59–66.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.01.016>

- Gilleard, J. S., Kotze, A. C., Leathwick, D., Nisbet, A. J., McNeilly, T. N., & Besier, B. (2021). A journey through 50 years of research relevant to the control of gastrointestinal nematodes in ruminant livestock and thoughts on future directions. In *International Journal for Parasitology* (Vol. 51, Issues 13–14, pp. 1133–1151). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2021.10.007>
- Hoste, H., Chartier, C., & le Frileux, Y. (2002). Maîtrise des strongyloses gastro-intestinales chez les chèvres laitières par l'application de traitements ciblés. In *Veterinary Research* (Vol. 33, Issue 5, pp. 531–545). EDP Sciences. <https://doi.org/10.1051/vetres:2002037>
- Hoste, H., Sotiraki, S., Landau, S. Y., Jackson, F., & Beveridge, I. (2010). Goat-Nematode interactions: Think differently. *Trends in Parasitology*, 26(8), 376–381. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.04.007>
- Hoste, H., Sotiraki, S., & Torres-Acosta, J. F. de J. (2011). Control of Endoparasitic Nematode Infections in Goats. In *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* (Vol. 27, Issue 1, pp. 163–173). <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2010.10.008>
- Kaplan, R. M. (2020). Biology, Epidemiology, Diagnosis, and Management of Anthelmintic Resistance in Gastrointestinal Nematodes of Livestock. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 36(1), 17–30. <https://doi.org/10.1016/J.CVFA.2019.12.001>
- Kenyon, F., Greer, A. W., Coles, G. C., Cringoli, G., Papadopoulos, E., Cabaret, J., Berrag, B., Varady, M., van Wyk, J. A., Thomas, E., Vercruyse, J., & Jackson, F. (2009). The role of targeted selective treatments in the development of refugia-based approaches to the control of gastrointestinal nematodes of small ruminants. *Veterinary Parasitology*, 164(1), 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.04.015>
- Kenyon, F., McBean, D., Greer, A. W., Burgess, C. G. S., Morrison, A. A., Bartley, D. J., Bartley, Y., Devin, L., Nath, M., & Jackson, F. (2013). A comparative study of the effects of four treatment regimes on ivermectin efficacy, body weight and pasture contamination in lambs naturally infected with gastrointestinal nematodes in Scotland. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 3, 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2013.02.001>
- Kenyon, F., Rinaldi, L., McBean, D., Pepe, P., Bosco, A., Melville, L., Devin, L., Mitchell, G., Ianniello, D., Charlier, J., Vercruyse, J., Cringoli, G., & Levecke, B. (2016). Pooling sheep faecal samples for the assessment of anthelmintic drug efficacy using McMaster and Mini-FLOTAC in gastrointestinal strongyle and Nematodirus infection. *Veterinary Parasitology*, 225, 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.03.022>
- Kotze, A. C., Gilleard, J. S., Doyle, S. R., & Prichard, R. K. (2020). Challenges and opportunities for the adoption of molecular diagnostics for anthelmintic resistance. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 14, 264–273. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2020.11.005>

- Lambertz, C., Pouloupoulou, I., Wuthijaree, K., & Gauly, M. (2018). Endoparasitic infections and prevention measures in sheep and goats under mountain farming conditions in Northern Italy. *Small Ruminant Research*, *164*, 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2018.05.007>
- Lambertz, C., Pouloupoulou, I., Wuthijaree, K., & Gauly, M. (2019). Anthelmintic efficacy against gastrointestinal nematodes in goats raised under mountain farming conditions in northern Italy. *BMC Veterinary Research*, *15*(1). <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1968-8>
- Manfredi, M. (2006). *Diagnostica delle endoparassitosi: importanza del riconoscimento degli elminti adulti*.
- Manfredi, M. T., di Cerbo, A. R., Zanzani, S., & Stradiotto, K. (2010). Breeding management in goat farms of Lombardy, northern Italy: Risk factors connected to gastrointestinal parasites. *Small Ruminant Research*, *88*(2–3), 113–118. <https://doi.org/10.1016/J.SMALLRUMRES.2009.12.018>
- Maurizio, A., Frangipane Di Regalbono, A., & Cassini, R. (2021). Quantitative monitoring of selected groups of parasites in domestic ruminants: A comparative review. In *Pathogens* (Vol. 10, Issue 9). MDPI. <https://doi.org/10.3390/pathogens10091173>
- Maurizio, A., Stancampiano, L., Tessarin, C., Pertile, A., Pedrini, G., Asti, C., Terfa, W., Frangipane Di Regalbono, A., & Cassini, R. (2021). Survey on endoparasites of dairy goats in north-eastern Italy using a farm-tailored monitoring approach. *Veterinary Sciences*, *8*(5). <https://doi.org/10.3390/vetsci8050069>
- Miller, B. A., & Lu, C. D. (2019). — Special Issue — Current status of global dairy goat production: An overview. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, *32*(8), 1219–1232. <https://doi.org/10.5713/ajas.19.0253>
- Morand-Fehr, P., Boutonnet, J. P., Devendra, C., Dubeuf, J. P., Haenlein, G. F. W., Holst, P., Mowlem, L., & Capote, J. (2004). Strategy for goat farming in the 21st century. *Small Ruminant Research*, *51*(2), 175–183. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2003.08.013>
- Morgan, E. R., Cavill, L., Curry, G. E., Wood, R. M., & Mitchell, E. S. E. (2005). Effects of aggregation and sample size on composite faecal egg counts in sheep. *Veterinary Parasitology*, *131*(1–2), 79–87. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.04.021>
- Morgan, E. R., Lanusse, C., Rinaldi, L., Charlier, J., & Vercruysse, J. (2022). Confounding factors affecting faecal egg count reduction as a measure of anthelmintic efficacy. *Parasite*, *29*. <https://doi.org/10.1051/parasite/2022017>
- Morgan, E. R., & van Dijk, J. (2012). Climate and the epidemiology of gastrointestinal nematode infections of sheep in Europe. *Veterinary Parasitology*, *189*(1), 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.03.028>

- Paoletti R., & Aceto P. (2007). *L'allevamento ovino e caprino in Europa e in Italia con particolare riferimento all'arco Alpino*. www.istat.it
- Peacock, C., & Sherman, D. M. (2010). Sustainable goat production—Some global perspectives. *Small Ruminant Research*, *89*(2–3), 70–80. <https://doi.org/10.1016/J.SMALLRUMRES.2009.12.029>
- Pugh, D. G. (David G.), & Baird, A. N. (Aubrey N. (2012). *Sheep and goat medicine*. Elsevier/Saunders.
- Rinaldi, L., Amadesi, A., Dufourd, E., Bosco, A., Gadanho, M., Lehebel, A., Maurelli, M. P., Chauvin, A., Charlier, J., Cringoli, G., Ravinet, N., & Chartier, C. (2019). Rapid assessment of faecal egg count and faecal egg count reduction through composite sampling in cattle. *Parasites and Vectors*, *12*(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3601-x>
- Rinaldi, L., & Cringoli, G. (2012). Parasitological and pathophysiological methods for selective application of anthelmintic treatments in goats. *Small Ruminant Research*, *103*(1), 18–22. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2011.10.014>
- Rinaldi, L., Levecke, B., Bosco, A., Ianniello, D., Pepe, P., Charlier, J., Cringoli, G., & Vercruysse, J. (2014). Comparison of individual and pooled faecal samples in sheep for the assessment of gastrointestinal strongyle infection intensity and anthelmintic drug efficacy using McMaster and Mini-FLOTAC. *Veterinary Parasitology*, *205*(1–2), 216–223. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.06.011>
- Roeber, F., & Kahn, L. (2014). The specific diagnosis of gastrointestinal nematode infections in livestock: Larval culture technique, its limitations and alternative DNA-based approaches. *Veterinary Parasitology*, *205*(3–4), 619–628. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.08.005>
- Rose Vineer, H., Morgan, E. R., Hertzberg, H., Bartley, D. J., Bosco, A., Charlier, J., Chartier, C., Claerebout, E., de Waal, T., Hendrickx, G., Hinney, B., Höglund, J., Jez Ek, J. I., Kašný, M., Keane, O. M., Martínez-Valladares, M., Mateus, T. L., McIntyre, J., Mickiewicz, M., ... Rinaldi, L. (2020). Increasing importance of anthelmintic resistance in European livestock: Creation and meta-analysis of an open database. *Parasite*, *27*. <https://doi.org/10.1051/parasite/2020062>
- Salgado, J. A., Cruz, L. V., da Rocha, L. O., Sotomaior, C. S., Borges, T. D., & Santos, C. D. P. (2019). Implication of the fecal egg count reduction test (FECRT) in sheep for better use of available drugs. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*, *28*(4), 700–707. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612019093>
- Sandrucci, A., Bava, L., Tamburini, A., Gislou, G., & Zucali, M. (2019). Management practices and milk quality in dairy goat farms in Northern Italy. *Italian Journal of Animal Science*, *18*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2018.1466664>

- Sargison, N. D. (2013). Understanding the epidemiology of gastrointestinal parasitic infections in sheep: What does a faecal helminth egg count tell us? *Small Ruminant Research*, *110*(2–3), 78–81. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.11.008>
- Silanikove, N. (2000). The physiological basis of adaptation in goats to harsh environments. *Small Ruminant Research*, *35*(3), 181–193. [https://doi.org/10.1016/S0921-4488\(99\)00096-6](https://doi.org/10.1016/S0921-4488(99)00096-6)
- Tammy, S., Keeton, N., & Navarre, C. B. (2018). *Coccidiosis in Large and Small Ruminants*. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2017.10.009>
- Taylor, M. (2002). Parasites of goats: A guide to diagnosis and control. *In Practice*, *24*(2), 76–89. <https://doi.org/10.1136/inpract.24.2.76>
- Taylor, M. A., Coop, R. L., & Wall, R. (Richard L.). (2015). *Veterinary parasitology 4th edition*.
- Torina, A., Dara, S., Marino, A. M. F., Sparagano, O. A. E., Vitale, F., Reale, S., & Caracappa, S. (2004). Study of gastrointestinal nematodes in sicilian sheep and goats. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1026*, 187–194. <https://doi.org/10.1196/annals.1307.028>
- Traversa, D., Paoletti, B., Otranto, D., & Miller, J. (2007). First report of multiple drug resistance in trichostrongyles affecting sheep under field conditions in Italy. *Parasitology Research*, *101*(6), 1713–1716. <https://doi.org/10.1007/s00436-007-0707-4>
- van Wyk, J. A. (2001). Refugia--overlooked as perhaps the most potent factor concerning the development of anthelmintic resistance. *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, *68*(1), 55–67.
- van Wyk, J. A., & Bath, G. F. (2002). The FAMACHA© system for managing haemonchosis in sheep and goats by clinically identifying individual animals for treatment. *In Veterinary Research* (Vol. 33, Issue 5, pp. 509–529). EDP Sciences. <https://doi.org/10.1051/vetres:2002036>
- van Wyk, J. A., & Mayhew, E. (2013). Morphological identification of parasitic nematode infective larvae of small ruminants and cattle: A practical lab guide. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, *80*(1). <https://doi.org/10.4102/ojvr.v80i1.539>
- Voigt, K., Geiger, M., Jäger, M. C., Knubben-Schweizer, G., Strube, C., & Zablotski, Y. (2022). Effectiveness of Anthelmintic Treatments in Small Ruminants in Germany. *Animals*, *12*(12), 1501. <https://doi.org/10.3390/ani12121501>
- Zachary, J. F. (2016). *Pathologic Basis of Veterinary Disease, 6th edition*.
- Zajac, A. M., & Garza, J. (2020). Biology, Epidemiology, and Control of Gastrointestinal Nematodes of Small Ruminants. *In Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* (Vol. 36, Issue 1, pp. 73–87). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2019.12.005>

Zanzani, S. A., Gazzonis, A. L., di Cerbo, A., Varady, M., & Manfredi, M. T. (2014).
Gastrointestinal nematodes of dairy goats, anthelmintic resistance and practices of
parasite control in Northern Italy. *BMC Veterinary Research*, 10.
<https://doi.org/10.1186/1746-6148-10-114>

SITOGRAFIA

FAOSTAT: <https://www.fao.org/faostat/en/>

AIA: <http://bollettino.aia.it/>

SCOPS: <https://www.scops.org.uk/>

COMBAR: <https://www.combar-ca.eu/>

COMBAR DATABASE: OSF | COMBAR_AR_database_LIVE.xlsx

ANAGRAFE NAZIONALE ZOOTECNICA: <https://www.vetinfo.it/>

ALLEGATO I

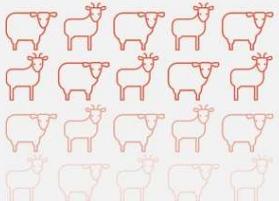
COMBAR FECRT PROTOCOL



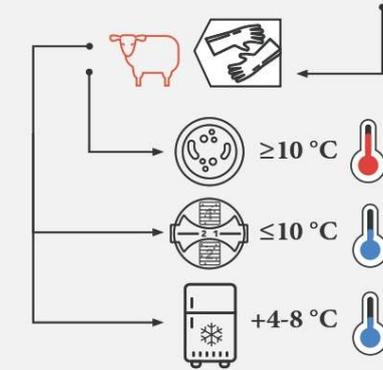
Sample collection



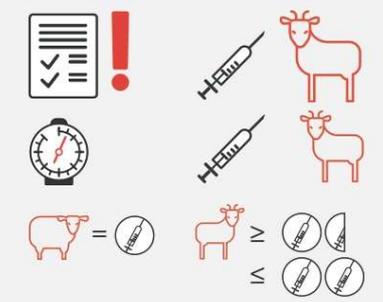
10 ≤



Sampling

Treatment instructions



Collect individual rectal faecal samples (minimum 5g, preferably 10g) from a minimum number of **10 animals** per group on the selected farms (Kaplan, 2020). Higher numbers, where available, will allow a more precise result. For sheep and goats, animals of all ages may be used, as long as egg counts meet the inclusion criteria (see below) (Kaplan, 2020).

In order to identify animals with high egg counts 15 (or more) animals can be selected pre-treatment, with post-treatment sampling focused on the 10 animals with the highest egg counts. Flocks should not have received anthelmintic treatments during the past six weeks (extended periods will apply if long-acting formulations have been applied).

The same animals must be sampled pre- and post-treatment, i.e. **on Day 0 and between 7 to 21 days after treatment, depending on the drugs tested.**

- *levamisole*: 7 to 10 days;
- *benzimidazoles*: 10 to 14 days;
- *ivermectin and other macrocyclic lactones*: 14 to 17 days;
- *moxidectin*: 17 to 21 days;
- *when testing in parallel two or more drugs in same flock*: 14 days (Coles et al., 1992; Kaplan, 2020).

Samples should best reach the lab at the day of sampling and be cooled to below 10°C during transport.

The samples can be stored for 5 days at +4-8 °C; if there is no possibility to analyse the samples within 5 days of sampling, keep the faecal samples in a **vacuum packed** plastic bag (Rinaldi et al., 2011) (or use anaerobic storage) and store them **up to three weeks** in the **fridge at +4-8 °C** (refrigeration is needed to prevent fungal growth).

Additionally, one composite sample (equal amounts from all individual samples for each drug), which should not be cooled below 10 °C before processing, will be taken to perform a larval culture.

Whichever route of administration of the respective anthelmintic drug is used, it is important to read the manufacturer's instructions carefully. It is important to apply specific dose rates for goats (usually 1.5 to 2 times the sheep dose) (Hoste et al., 2011).

Particular attention should be paid to: avoid under dosing, dose according to individual liveweight or the heaviest animal using scales. Ensure that the equipment is appropriate for the product and is calibrated to deliver the dose accurately. On farms where more than one drug is tested and if one of these is a pour-on product, any contact of animals between groups should be prevented.

Faecal egg count (FEC)



On each individual sample, FEC will be performed to obtain worm EPG (eggs per gram of faeces) data using a quantitative copro-microscopic method e.g. Mini-FLOTAC, McMaster, FECPAKG2 etc. using saturated sodium chloride (specific gravity = 1.200) as flotation solution. When low number of eggs are expected sensitive methods are recommended (e.g. Mini-FLOTAC, analytic sensitivity of 5 EPG) (Cringoli et al., 2017).

To ensure reliable conclusions on the drug efficacy, a **minimum number of 200 eggs per treatment group** need to be counted prior treatment (Kaplan, 2020). This number is the total number of eggs counted across the 10 animals sampled and is thus not the number of EPG. Therefore, if this number was not obtained following analysis of all samples the practical solution is to examine a second aliquot of each of the same samples (i.e. leading to an analytic sensitivity of 2.5 EPG if for example Mini-FLOTAC is being used).

Consequently, the same analytic sensitivity has to be employed also for examining the post treatment samples of the same animals (**see the flow-chart in Annex 1**). The total number of eggs counted (≥ 200) under the microscope compensates for the variations in both study design (analytic sensitivity and sample size) and host-parasite interactions (level and aggregation of egg excretion) (Levecke et al., 2018).

Perform the egg count of gastrointestinal strongyles, *Nematodirus* and other nematodes (e.g. *Strongyloides*, *Trichuris*, etc.) separately.

Species identification



Can be conducted either using morphological examination of L3 from coprocultures or using molecular techniques using either L3 from coprocultures or eggs/L1.

Coprocultures



Coprocultures will be performed pre- and post-treatment per farm for **identification of nematode larvae (L3)** according to the procedures and morphological keys of van Wyk and Mayhew (2013).

Separate pooled samples need to be prepared using faecal samples which were not cooled, since cooling may affect the hatching and/or larval development. L3 should be maintained in water, at 4 °C until morphological examination.

Molecular analysis



If samples are to be analysed using molecular methods, then obtained larvae/eggs from pre- and post-treatment samples can either be stored in DNA extraction buffer at 4 °C, in 70% ethanol or in dH₂O at -20 °C to -80 °C until further molecular analysis.

Anthelmintic efficacy

The recommended methods to calculate FECR and confidence intervals are:

- ▶ R package 'eggCounts' that uses a Bayesian hierarchical model (Wang et al., 2018)
<http://shiny.math.uzh.ch/user/furrer/shinyas/shiny-eggCounts/>

- ▶ Beta negative binomial method analysis tool by Matthew Denwood
https://mdenwood.shinyapps.io/fecrt_bnb/

Anthelmintic treatment efficacy is interpreted according to the following table based on WAAVP guidelines (Coles et al., 1992), lastly reviewed by Levecke et al. (2018).

Efficacy	Results
Reduced	FECR <95% and lower limit of the 95% Confidence Interval <90%
Doubtful	Either FECR <95% or lower limit of the 95% Confidence Interval <90%
Normal	FECR ≥95% and lower limit of the 95% Confidence Interval ≥90%

Practical example using Mini-FLOTAC with a lower detection limit of 5 EPG*

Animal #	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Σ	Factor	Mean EPG
1 st FEC. Sum of eggs counted in two chambers (= 1 Mini-FLOTAC device):	6	7	28	0	8	13	7	26	9	9	113	5	56.6
2 nd FEC. Sum of eggs counted in two chambers (= 1 Mini-FLOTAC device):	8	5	26	2	3	11	10	28	8	9	110	5	55
Counts to be entered in R package 'eggCounts'	14	12	54	2	11	24	17	54	17	18	223	2.5	55.75

* Another approach is to increase the number of animals per group

.