

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

Corso di Laurea Magistrale a Ciclo Unico in
MEDICINA VETERINARIA

**STRONGILOSI GASTROINTESTINALI DEI BOVINI:
VALUTAZIONE DELL'ANTIELMINTICO-RESISTENZA
IN ALLEVAMENTI DELLA REGIONE VENETO**

Relatore: Prof. Antonio Frangipane di Regalbono

Laureanda: Eleonora Pallua
Matricola n. 615805

ANNO ACCADEMICO 2013 – 2014

*A mamma e papà, che non mi hanno mai fatto mancare il loro sostegno
e senza i quali non avrei potuto realizzare il mio sogno...*

*A mia sorella Chiara, che mi ha supportato e sopportato
in questi cinque anni di convivenza padovana...e non solo!*

*Al mio relatore, il Prof. Frangipane,
per il prezioso aiuto e la sua grande disponibilità,
e alla Dott.ssa Cinzia Tessarin,
che ha allietato le mie giornate in laboratorio...*

*Infine a tutte le persone che mi vogliono bene
e mi sono state vicine in questa avventura...*

...Grazie di cuore!

Tutto questo non sarebbe stato possibile senza di voi!

INDICE

INDICE.....	5
1. INTRODUZIONE.....	7
2. STRONGILOSI GASTROINTESTINALI DEI BOVINI.....	9
2.1. Tassonomia: la classe Nematoda.....	9
2.2. Gli Strongili gastrointestinali dei bovini.....	12
2.3. Ciclo biologico ed epidemiologia.....	12
2.3.1. Ciclo vitale.....	12
2.3.2. Fattori influenzanti la fase esogena.....	14
2.3.3. Fattori influenzanti la fase endogena.....	15
2.3.4. Ipobiosi.....	16
2.4. Principali Strongili gastrointestinali.....	16
2.5. Diffusione in Italia.....	23
2.6. Patogenesi e sintomatologia.....	24
2.7. Diagnosi.....	27
2.7.1. Esame coprologico.....	28
2.7.1.1. Esame copromicroscopico qualitativo.....	28
2.7.1.2. Esame copromicroscopico quantitativo.....	29
2.7.2. Dosaggio del pepsinogeno.....	30
2.7.3. Dosaggio degli anticorpi contro <i>Ostertagia</i>	31
2.8. Terapia e controllo.....	31
2.8.1. Farmaci antielmintici.....	31
2.8.2. Chemioresistenza.....	36
2.8.3. Piani di lotta.....	39
3. MATERIALI E METODI.....	43
3.1. Selezione delle aziende.....	43
3.2. Selezione dei soggetti.....	43
3.3. FECRT (<i>Fecal Egg Count Reduction Test</i>).....	44
3.4. Protocollo terapeutico.....	46
3.5. Analisi di laboratorio.....	47
3.5.1. Esami copromicroscopici quantitativi.....	47
3.5.2. Coproculture.....	47

3.5.3. Isolamento delle larve L3: la tecnica di Baermann.....	48
3.5.4. Identificazione dei generi parassitari.....	48
4. RISULTATI.....	51
4.1. Campionamenti e trattamento.....	51
4.2. FECRTs.....	51
4.3. Identificazione dei generi di Strongili gastrointestinali.....	53
5. CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE.....	55
6. BIBLIOGRAFIA.....	58
7. SITI INTERNET CONSULTATI.....	66

1. INTRODUZIONE

Le strongilosi gastrointestinali (SGI) dei ruminanti sono malattie parassitarie a diffusione universale, responsabili d'ingenti perdite nelle produzioni zootecniche anche laddove siano assenti sintomi clinici evidenti (Ambrosi, 1995).

Tali parassitosi interessano sia animali da latte che da carne e sebbene il pascolo rappresenti il principale fattore di rischio, neppure i bovini allevati unicamente a stabulazione possono esserne considerati esenti.

L'infestazione si traduce in un importante calo dell'incremento ponderale e nella diminuzione sia quantitativa che qualitativa della produzione lattea. Tali ripercussioni sulle *performances* produttive hanno spinto, negli anni, gli allevatori ad impostare nei confronti di questi parassiti cosmopoliti una lotta sistematica, ma purtroppo non sempre adeguata: l'uso intensivo di farmaci antielmintici ad ampio spettro ha infatti favorito l'insorgenza di fenomeni di chemioresistenza, che ha ridotto drasticamente l'efficacia dei principi attivi più comunemente utilizzati per il trattamento di queste elmintiasi.

I gruppi farmacologici storicamente impiegati nel controllo delle SGI sono benzimidazolici (albendazolo, fenbendazolo, oxfendazolo...) e pro-benzimidazolici (febantel, netomibin, tiofanato), imidazotiazolici (levamisolo), tetraidropirimidine (pyrantel e morantel) e i lattoni macrociclici (avermectine e milbemicine).

Per i benzimidazolici il fenomeno della chemioresistenza è stato studiato in maniera più approfondita, specie negli ovini, arrivando a definirne le basi genetiche attraverso l'identificazione delle sequenze geniche sensibili (Elard *et al.*, 1999; Silvestre *et al.*, 2002; Alvarez Sanchez *et al.*, 2005; Palcy *et al.*, 2010), ma nuove informazioni stanno emergendo ormai anche per i lattoni macrociclici (Von Samson-Himmelstjerna, 2006; Prichard *et al.*, 2007; Suarez *et al.*, 2007; Lespine *et al.*, 2012; Areskog *et al.*, 2013; Demeler *et al.*, 2013).

Le segnalazioni d'isolamento di popolazioni parassitarie resistenti a questi diversi composti sono ormai sempre più frequenti non solo in Europa, ma in tutto il mondo (Fiel *et al.*, 2001; Anziani *et al.*, 2004; Soutello *et al.*, 2007; Condi *et al.*, 2009; Gasbarre *et al.*, 2009; Demeler *et al.*, 2009; Kaplan *et al.*, 2012) e rendono indispensabile un utilizzo oculato dei farmaci ad oggi disponibili, soprattutto se si considera che dall'introduzione dell'ivermectina nel 1981, non sono state immesse sul mercato altre

classi di antelmintici e che con ogni probabilità non ne verranno commercializzate di nuove neppure nei prossimi anni.

Proprio per questi motivi, è fondamentale adottare un sistema di monitoraggio che consenta di valutare l'efficacia dei trattamenti farmacologici per intervenire in maniera strategica laddove emergano popolazioni resistenti.

A tale proposito, la W.A.A.V.P. (World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology) ha emesso delle linee guida per l'individuazione di fenomeni di antelmintico-resistenza (Coles *et al.*, 1992; Wood *et al.*, 1995). La prova in vivo definita FECRT rappresenta indubbiamente una delle metodiche ad oggi maggiormente utilizzate; la possibilità di essere infatti applicata, pur se con delle criticità, a tutte le specie ed a tutte le tipologie di antelmintici la rende un utile strumento di controllo.

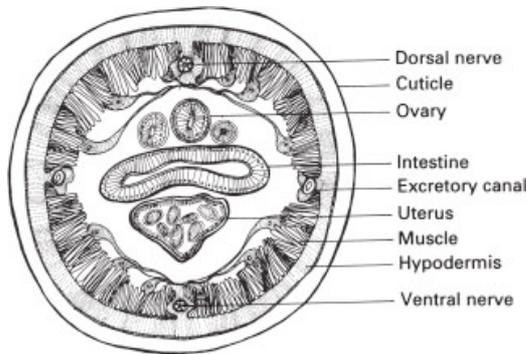
Lo scopo di questo studio è stato dunque quello di mettere a confronto l'efficacia di due diverse molecole antelmintiche, ivermectina e moxidectina, entrambe appartenenti alla classe dei lattoni macrociclici, attraverso l'esecuzione di prove di FECRT in cinque diversi allevamenti di bovini da carne della regione Veneto.

2. STRONGILOSI GASTROINTESTINALI DEI BOVINI

2.1. Tassonomia: la classe Nematoda

Gli strongili gastrointestinali (SGI) sono parassiti appartenenti al phylum dei Nematodi, elminti di forma cilindrica non segmentati, a sessi separati e caratterizzati da dimorfismo sessuale.

Le dimensioni variano, secondo la specie, da pochi millimetri ad alcuni centimetri; il corpo è rivestito da una cuticola e dotato di cellule muscolari che conferiscono al parassita la capacità di muoversi autonomamente.



L'ipoderma, responsabile della secrezione della cuticola, si approfonda verso la cavità celomatica formando quattro corde: la dorsale e la ventrale contengono i nervi, mentre nelle due laterali sono alloggiati i canali escretori, che raccolgono i cataboliti del parassita e li convogliano verso il poro escretore.

Figura 1. Sezione trasversale di femmina di Nematode (*Vet. parasitology, Taylor et al. 2007*). La cavità celomatica contiene l'apparato digerente di forma tubolare, costituito da un'apertura buccale, collocata all'estremità cefalica dell'elminta, che comunica direttamente con l'esofago; gli SGI, in particolare, possono essere provvisti di una capsula buccale più o meno sviluppata, eventualmente dotata di placche o denti che consentono al parassita di penetrare a fondo nella mucosa dell'ospite.

L'esofago, di natura muscolare o muscolo-ghiandolare, come nelle famiglie Filaroidea e Spiruroidea, varia per morfologia, rappresentando un carattere utile all'identificazione degli stadi adulti.

L'intestino, anch'esso di forma cilindrica, termina nell'apertura anale nelle femmine o nella cloaca nei maschi, sbocco comune al tratto digerente e al deferente.

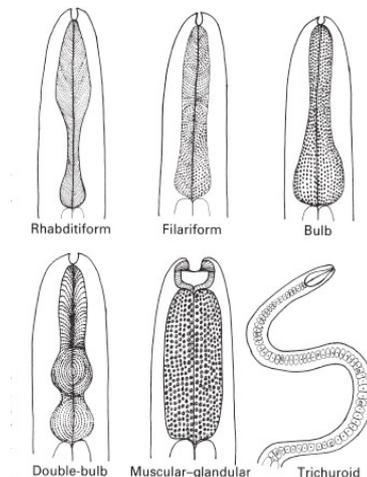


Figura 2. Morfologia dell'esofago nei Nematodi (*Veterinary parasitology, Taylor et al., 2007*).

La morfologia dell'apparato riproduttore maschile fornisce importanti indizi per il riconoscimento delle diverse specie; esso è costituito da un singolo testicolo, che comunica con la cloaca attraverso il deferente e il dotto eiaculatore, e da alcuni organi accessori rappresentati dagli spicoli (generalmente due), strutture chitinose utilizzate dal maschio per indirizzare il materiale seminale nella vagina della femmina durante la copula (Fig. 3), e dal *gubernaculum*, anch'esso in chitina, responsabile del loro orientamento.

L'apparato riproduttore femminile invece comprende ovaio, ovidotto e utero, doppi in alcune specie, vagina e vulva; in corrispondenza della porzione terminale del corpo, la cuticola può modificarsi e formare un'espansione definita "flap". Analogamente, nel maschio può essere presente la borsa copulatoria, sostenuta da raggi o coste, che trattiene la femmina durante l'accoppiamento e permette di suddividere i Nematodi in due gruppi: i bursati e i non bursati (Tab.1).

Altre modificazioni cui può andare incontro la cuticola sono: la corona e le vescicole cervicali, che circondano l'apertura buccale, le vescicole caudali e le ali cervicali, collocate nella regione esofagea, le papille e le ali caudali, attorno all'apertura anale. Apparato respiratorio e circolatorio sono assenti.



Figura 3. Estremità posteriore di un maschio di *Trichostrongylus axei* con evidenza di spicoli e borsa caudale. ("Parassiti d'Italia", Società italiana di parassitologia).

Tabella 1. Classificazione semplificata dei nematodi parassiti d'interesse veterinario tratta da "Parassitologia veterinaria" G.M. Urquhart, 1998 (sono evidenziati in grassetto i generi che rientrano nei cosiddetti “strongili gastrointestinali”)

Phylum	Nematelminthes	
Classe	Nematoda	
<i>Bursati</i>	Superfamiglia	Genere
	Trichostrongyloidea	<i>Dictyocaulus</i> <i>Haemonchus</i> <i>Trichostrongylus</i> <i>Ostertagia</i> <i>Cooperia</i> <i>Nematodirus</i> <i>Hyostromgylus</i>
	Strongyloidea	<i>Strongylus</i> <i>Triodontophorus</i> <i>Trichonema</i> <i>Chabertia</i> <i>Oesophagostomum</i> <i>Bunostomum</i> <i>Ancylostoma</i> <i>Uncinaria</i> <i>Syngamus</i>
	Metastromyloidea	<i>Protostrongylus</i> <i>Muellerius</i> <i>Cystocaulus</i> <i>Neostromgylus</i> <i>Metastrongylus</i>
	Rhabditoidea	<i>Strongyloides</i>
	Ascaridoidea	<i>Ascaris</i> <i>Parascaris</i> <i>Toxocara</i> <i>Ascaridia</i> <i>Heterakis</i>
<i>Non bursati</i>	Oxyuroidea	<i>Oxyuris</i>
	Spiruroidea	<i>Spirocerca</i> <i>Thelazia</i> <i>Habronema</i>
	Filaroidea	<i>Dirofilaria</i> <i>Setaria</i>

		<i>Parafilaria</i> <i>Onchocerca</i>
	Trichuroidea	<i>Trichuris</i> <i>Capillaria</i> <i>Trichinella</i>
	Diectophymatoidea	<i>Diectophyma</i>

2.2. Gli Strongili gastrointestinali dei bovini

Il termine “strongili” è utilizzato in realtà in maniera impropria, poiché i parassiti che vengono comunemente ascritti a questo gruppo non appartengono al genere *Strongylus*, che parassita peraltro solo gli equidi, ma a diversi altri generi parassitari. Ciascuno di questi riconosce come localizzazione elettiva, allo stadio adulto, un diverso tratto dell’apparato gastrointestinale (in Tabella 2 è riportata la sede per ciascun genere) con un’elevata specie-specificità, eccezion fatta per *Trichostrongylus axei*, capace di parassitare sia ruminanti che equini e suini.

Tabella 2. Localizzazione elettiva dei diversi generi di SGI dei ruminanti.

Localizzazione	Genere parassitario
ABOMASO	<i>Ostertagia</i> <i>Haemonchus</i> <i>Trichostrongylus</i>
INTESTINO TENUE	<i>Cooperia</i> <i>Nematodirus</i> <i>Strongyloides</i> <i>Bunostomum</i> <i>Trichostrongylus</i>
INTESTINO CRASSO	<i>Chabertia</i> <i>Oesophagostomum</i>

2.3. Ciclo biologico ed epidemiologia

2.3.1. Ciclo vitale

Gli SGI sono parassiti a ciclo biologico diretto caratterizzato da una fase endogena e una fase esogena. L’intero ciclo vitale di questi elminti comprende cinque

stadi larvali, indicati con L₁, L₂, L₃, L₄ e L₅ (stadio in realtà adulto ma non ancora sessualmente maturo), e quattro mute.

Figura 6. Uovo larvato di *Strongyloides papillosus*.



Gli individui adulti sono localizzati nel tratto gastroenterico dell'ospite e producono uova che vengono emesse con le feci; la parete di quest'ultime è costituita da tre strati: il più interno, sottile, è formato da componenti lipidiche che lo rendono impermeabile, quello intermedio invece, in chitina, conferisce rigidità all'uovo, mentre quello esterno è di natura proteica.

L'osservazione delle uova, che non differiscono per morfologia, non fornisce elementi utili all'identificazione del genere parassitario, per la quale si rende quindi necessaria la coprocultura; l'unica eccezione è rappresentata da *Nematodirus*, che produce uova di dimensioni maggiori (150-212 µm x 75-108 µm) contenenti blastomeri più grandi, meno numerosi e di colore molto scuro (Fig. 4 e Fig. 5).



Figura 4. Tipico uovo di *Nematodirus* (A) a confronto con uova di altri strongili (B).



Figura 5. Uovo di *Nematodirus*.

La schiusa è condizionata da fattori ambientali quali umidità e temperatura e sono gli enzimi prodotti dalle larve L₁ a digerire lo strato lipidico interno e a determinare poi, accrescendosi, la rottura dei restanti due.

Nel caso di *Nematodirus* le larve non abbandonano l'uovo fino ad aver raggiunto lo stadio L₃, risultando maggiormente protette anche in condizioni climatiche sub-ottimali. L'evoluzione alla forma infestante L₃ avviene in un tempo minimo di sette giorni,

eccezion fatta per *Strongyloides papillosus* che impiega soli quattro giorni per maturare, grazie all'emissione di uova già larvate (Fig. 3).

In questo stadio, la sopravvivenza del parassita nell'ambiente si aggira attorno alle 8 settimane.

L'infestazione dell'ospite definitivo avviene attraverso l'ingestione delle larve L₃ o, nel caso di *Bunostomum* e *Strongyloides*, anche per via transcutanea; questi ultimi possono infatti penetrare la cute a livello dello spazio interdigitale, invadere il circolo e migrare poi attraverso il parenchima polmonare; da qui, risalendo l'albero respiratorio, le larve giungono in faringe e vengono deglutite raggiungendo così la loro sede definitiva nel tratto gastroenterico.

Il periodo di prepatenza si aggira attorno alle 3-4 settimane.

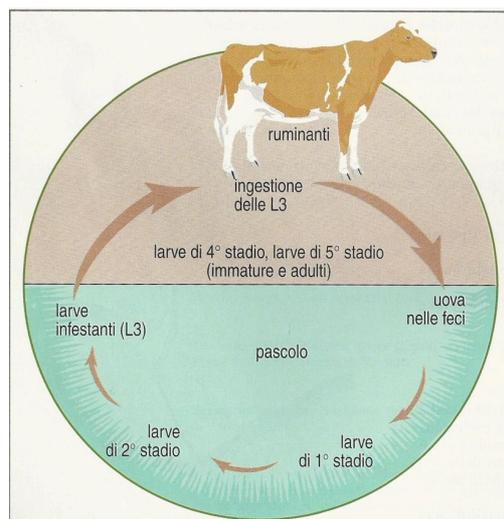


Figura 7. Ciclo biologico degli SGI (Jacquet, 1998).

2.3.2. Fattori influenzanti la fase esogena

La sopravvivenza degli stadi larvali nell'ambiente è fortemente influenzata dalle condizioni climatiche e, in particolare, da umidità, temperatura ed ossigenazione.

In generale, lo sviluppo dei parassiti è favorito da temperature tra i 15 e i 25°C, mentre è rallentato tra i 10 e i 15°C e fortemente inibito sotto i 10°C; d'altro canto anche temperature elevate (> 35°) ostacolano la maturazione larvale.

Gli stadi L₃ dei generi *Nematodirus* e *Ostertagia* risultano particolarmente resistenti alle basse temperature e possono sopravvivere sui pascoli anche per l'intero inverno, causando la reinfestazione degli animali nella successiva stagione di pascolo.

L'umidità relativa elevata (oltre l'80%) rappresenta un altro requisito essenziale allo sviluppo del parassita e così anche la presenza di un terreno ben aerato.

Altrettanto importanti sono le caratteristiche pedologiche del pascolo e la sua composizione: terreni poveri di sali, non molto acidi e dotati di un manto erboso sufficiente a proteggere dalla radiazione solare diretta offrono condizioni ottimali.

Altro fattore dal ruolo essenziale è la gestione del pascolo: un'eccessiva densità di pascolamento così come lo sfruttamento prolungato nel tempo di una stessa area espone gli animali ad un maggior rischio d'infestazione. Ciò comporta, infatti, un aumento della contaminazione fecale del pascolo, dovuta all'elevato numero di soggetti caricati su quell'areale, e, allo stesso tempo, la permanenza prolungata garantisce l'infestazione degli animali ad opera delle larve che hanno ormai raggiunto lo stadio infestante.

2.3.3. Fattori influenzanti la fase endogena

Lo stato immunitario dell'ospite condiziona notevolmente la fase endogena del ciclo biologico: animali immunodepressi, con infezioni concomitanti o giovani non ancora completamente immunocompetenti non riescono a contrastare efficacemente l'infestazione.

Un soggetto in buono stato di salute, infatti, è in grado di limitare la colonizzazione da SGI grazie ad un meccanismo di natura immunitaria definito "*self cure*": il sistema immunitario dell'ospite interviene in risposta alla sensibilizzazione indotta dai cataboliti del parassita rilasciando amine vasoattive (una tra tutte l'istamina), che favoriscono il passaggio delle immunoglobuline dal torrente ematico al lume intestinale, l'aggressione e infine l'espulsione del parassita con la peristalsi intestinale (Ambrosi, 1995).

E' importante inoltre notare come anche la stagionalità e lo stato fisiologico dell'ospite influenzino l'eliminazione fecale di uova. E' stato, infatti, osservato un aumento dell'escrezione non solo nella stagione primaverile ("*spring rise*"), periodo in cui il clima è particolarmente favorevole allo sviluppo larvale e quindi chiave nella diffusione della parassitosi, ma anche in prossimità del parto (*periparturient* o *lactation rise*) (Eysker *et al.*, 1982) e, sebbene l'entità di tali fenomeni sia maggiore nella specie ovina,

appare chiara l'importanza che essi rivestono nell'epidemiologia delle SGI anche nell'allevamento bovino. Bisogna poi tenere presente che a modulare tali variazioni non sono solo fattori immunitari ed endocrini ma anche nutrizionali e genetici.

Infine la fase endogena risulta condizionata anche dal parassita stesso, sia perché esistono generi più prolifici di altri (così le femmine di *Haemonchus*, ad esempio, rispetto a quelle di *Trichostrongylus* ed *Ostertagia*) sia perché in caso d'infestazione massiva sono i parassiti stessi a modulare il proprio ciclo biologico attraverso l'ipobiosi.

2.3.4. Ipobiosi

L'ipobiosi consiste nell'arresto dello sviluppo allo stadio larvale che questi parassiti possono mettere in atto qualora non trovino condizioni favorevoli al completamento del proprio ciclo biologico.

Con questo meccanismo di adattamento le larve L₄ entrano in uno stato di quiescenza che consente loro di sopravvivere ben protette all'interno dell'organismo ospite.

I fattori che possono scatenare questo fenomeno vengono distinti in ambientali, relativi all'ospite e relativi al parassita; della prima categoria fanno parte la temperatura (sia bassa che elevata), l'umidità ed il fotoperiodo (sembra che all'accorciarsi di quest'ultimo aumentino le larve ipobiotiche) (Ambrosi, 1995).

Nei fattori relativi all'ospite rientra l'immunità dell'animale infestato, mentre all'ultimo gruppo appartengono i fenomeni sopra citati di autoregolazione da parte della popolazione parassitaria stessa in caso di sovraccarico elmintico.

Per tutti questi motivi, l'ipobiosi costituisce un fenomeno estremamente variabile, per il quale esiste inoltre una predisposizione più spiccata in determinati generi (ad esempio *Ostertagia*); essa ha notevoli ripercussioni sulla lotta alla parassitosi, poiché durante questa fase l'esame copromicroscopico dà esito negativo, pur essendo l'ospite infestato e quindi, a sua volta, fonte d'infestazione nella successiva stagione di pascolo.

2.4. Principali Strongili gastrointestinali

· *Haemonchus*

H. placei viene generalmente considerato specifico della specie bovina. L'individuo adulto, di dimensioni maggiori rispetto agli altri SGI (fino a 2-3 cm), è facilmente identificabile nell'abomaso (Fig. 8), dove svolge un'importante azione



Figura 8: adulti di *Haemonchus* nell'abomaso((© Department of Tropical Animal Health *The Royal School of Veterinary Studies*).

ematofagica (ogni individuo può sottrarre fino a 0.05 ml di sangue al giorno), responsabile delle gravi forme anemiche osservabili soprattutto nei soggetti colpiti da infestazioni massive (Urquhart *et al.*, 1998).

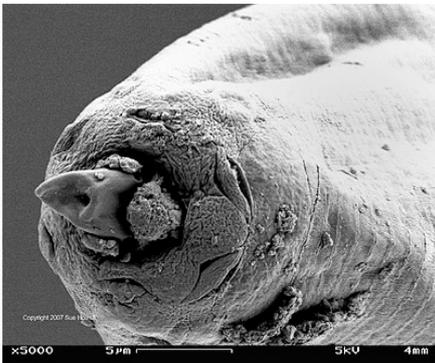
La sua capsula buccale è infatti dotata di una piccola lancetta che consente al

parassita di attingere ai vasi sanguigni che decorrono nella mucosa (Fig. 9).

L'escrezione fecale di uova per questo genere è elevatissima e le condizioni ottimali per il loro sviluppo sono rappresentate da umidità relativa e temperatura elevate (22-25°C).

Le larve che ne derivano sono poco resistenti al clima estivo e incapaci di superare la stagione invernale nell'ambiente esterno, ma in grado di andare in ipobiosi.

Una fase di migrazione nella mucosa abomasale precede il raggiungimento dello stadio



adulto dopo l'ingestione da parte dell'ospite e può determinare gravi abomasiti emorragiche.

Figura 9: lancetta buccale di *Haemonchus contortus* (<http://archive.sciencewatch.com/dr/erf/2008/08aprerf/08aprerfKap1/>).

· *Cooperia*

Il parassita maturo, molto sottile e corto (5-10 mm) e dotato di una grossa borsa copulatoria, si localizza nell'intestino tenue. Le larve sviluppano bene con climi miti ma la loro resistenza varia con la specie (la maggior parte sopravvive dai due ai quattro mesi alle basse temperature, mentre *Cooperia oncophora* resiste alla stagione invernale).

C. oncophora, più diffusa nelle aree temperate, viene in generale considerata scarsamente patogena; tuttavia infestazioni sostenute da questa specie possono comunque tradursi in importanti cali dell'incremento ponderale o, nel caso d'infestazioni massive, anche in diarrea. *C. punctata* e *C. pectinata* invece, più comuni nelle aree calde e tropicali, hanno la capacità di migrare attraverso la mucosa intestinale e possono quindi provocare facilmente diarree dovute all'atrofia dei villi e alla riduzione della capacità di assorbimento.

Ostertagia

Rappresenta il genere a più alta patogenicità. Gli adulti (0,6-0,9 cm di lunghezza), di colore rosso brunastro diversamente da quelli degli altri generi, colonizzano l'abomaso e producono uova capaci di svilupparsi a temperature piuttosto basse, ma allo stesso tempo resistenti anche a climi caldo-asciutti.

Anche le larve che ne derivano, dotate di una spiccata tendenza all'ipobiosi, resistono molto bene al clima invernale e, una volta ingerite, completano il proprio sviluppo nel lume delle ghiandole gastriche con gravi ripercussioni sulla fisiologia dell'organo.

Il danno indotto dal parassita, infatti, si

traduce nella sostituzione delle cellule produttrici di acido cloridrico con cellule indifferenziate a rapida replicazione. La ridotta produzione di succhi gastrici che ne consegue comporta un aumento del pH gastrico fino ad un valore 7 con conseguente riduzione dell'effetto batteriostatico e mancata conversione del pepsinogeno in pepsina, indispensabile per la digestione delle proteine, oltre che un'alterazione della permeabilità della mucosa alle macromolecole. La grave perdita di proteine che ne



Figura 10: noduli da *Ostertagia* nell'abomaso (sopra); edema ed emorragie abomasali da *Ostertagia* (sotto).

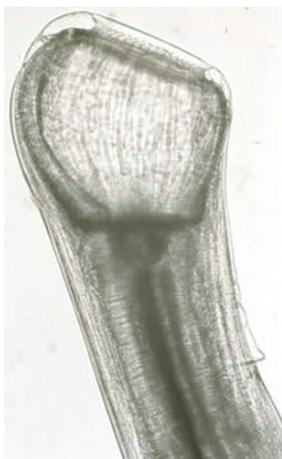
deriva sembra essere la principale responsabile delle perdite zootecniche che la malattia comporta.

Vengono inoltre distinte due forme cliniche di ostertagiosi: quella di *tipo I*, causata dall'ingestione delle larve L₃ presenti nell'ambiente che si manifesta quindi in genere dopo l'inizio della prima stagione di pascolo, e l'*ostertagiosi di tipo II*, provocata invece dalla maturazione delle larve L₄ ipobiotiche assunte nella precedente stagione di pascolo, che si manifesta quindi nel successivo tardo inverno/ inizio primavera (Urquhart *et al.*, 1998). In entrambi i casi, gli animali presentano diarrea profusa, diminuzione dell'ingestione volontaria e calo dell'incremento ponderale.

Macroscopicamente, l'infestazione si traduce nella formazione di noduli di 1-2 mm di diametro con un orifizio centrale. Le pliche abomasali diventano quindi edematose e ipertrofiche, fortemente emorragiche nei casi più gravi (Fig. 10).

· ***Chabertia***

La sede definitiva è rappresentata dal grosso intestino, dove gli adulti istofagi (1,2-2 cm di lunghezza) aggrediscono la mucosa grazie all'ampia capsula buccale di cui sono dotati (Fig. 11), causando importanti perdite ematiche e plasmatiche con conseguenti anemia e ipoalbuminemia, fino a diarrea nei casi più gravi.



Le larve non sono particolarmente resistenti e superano l'inverno solo nelle regioni a clima temperato, ma possono sopravvivere in forma ipobiotica nello spessore della mucosa dell'intestino tenue dell'organismo ospite.

Le L₃, una volta ingerite, penetrano nella mucosa del tenue, dalla quale emergono dopo una settimana circa come L₄. Queste migrano poi al cieco per evolvere, nel giro di circa 25 giorni, a L₅ e quindi allo stadio adulto, che si porta nel colon.

Figura 11: capsula buccale di *Chabertia ovina* (Courtesy of Dr. Dietrich Barth, Merial).

· ***Oesophagostomum***

E' tipico delle aree tropicali e subtropicali, ma presente anche in quelle temperate, montane e pedemontane, dove le L₃ possono resistere all'inverno anche in forma libera nell'ambiente.

Il parassita adulto è distinguibile da *Chabertia* per l'estremità cefalica affusolata (la capsula buccale è di piccole dimensioni), che fornisce anche informazioni utili al riconoscimento di specie.

Come per *Chabertia*, gli individui adulti si localizzano nel grosso intestino; le larve L₃ una volta ingerite, penetrano nella mucosa intestinale, dove mutano a L₄ per emergere poi e migrare nel colon, sede definitiva.

Tale ciclo biologico spiega quindi le enteriti e le lesioni ulcerative osservabili nei soggetti parassitati. Le infestazioni dei bovini da *Oe. radiatum*, in particolare, sono caratterizzate dalla formazione di noduli particolarmente evidenti (circa 5 mm di diametro) a carico della mucosa intestinale, esito della migrazione larvale e talvolta dal vero e proprio incistamento delle larve L₄ che hanno bloccato temporaneamente il proprio sviluppo.

La fase acuta della malattia coincide proprio con il momento in cui le L₄ emergono dalla mucosa e decorre dunque nel periodo prepatente; quest'ultimo aspetto complica la diagnosi poiché un esame copromicroscopico eseguito in questo momento darebbe comunque esito negativo.

Anche in questo caso, gli animali infestati presentano diarrea, scarso appetito e dimagrimento fino a importanti quadri di anemia e ipoalbuminemia.

· ***Bunostomum***

Il parassita adulto si distingue sia per le notevoli dimensioni (può raggiungere i 3 cm di lunghezza) sia per il caratteristico aspetto ad uncino.

E' provvisto di una capsula buccale ben armata, dotata di due placche taglienti e un grosso dente coniforme; questo genere è, infatti, fortemente ematofago e l'anemia e l'ipoalbuminemia rappresentano proprio i sintomi principali, sebbene non patognomonici, dell'infestazione.

Altra peculiarità di *Bunostomum* è rappresentata dalla capacità di penetrare all'interno dell'ospite definitivo non solo per ingestione ma anche per via transcutanea; ciò può causare prurito e irrequietezza tra gli animali e le lesioni indotte possono venire facilmente infettate da patogeni secondari con conseguenti zoppie.

Anche in questo caso il parassita ha una diffusione cosmopolita, ma il rischio d'infestazione aumenta notevolmente in aree tropicali o in stagioni particolarmente

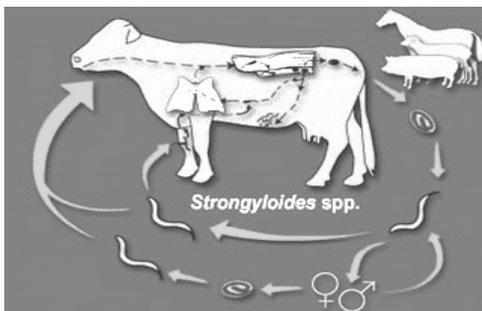
piovose, dal momento che l'umidità elevata è una condizione indispensabile al completamento del ciclo biologico.

· *Strongyloides*

S. papillosus è la specie che parassita i ruminanti. Si tratta di un nematode sottile e di piccole dimensioni (meno di un cm di lunghezza), il cui ciclo biologico si distingue da quello comune agli altri SGI per diversi aspetti. Innanzitutto, solo le femmine parassitano l'ospite, localizzandosi nell'intestino tenue; queste producono uova partenogenetiche che vengono eliminate con le feci e, una volta raggiunto l'ambiente esterno, lo sviluppo a L₃ avviene in soli quattro giorni se le condizioni ambientali sono buone. *Strongyloides* elimina, infatti, uova già larvate e questo riduce il tempo sul pascolo necessario allo sviluppo della forma infestante.

Tuttavia, accanto al ciclo parassitario, questi elminti possono anche intraprendere un ciclo a vita libera, caratterizzato dalla maturazione di maschi e femmine che si accoppiano nell'ambiente fino a quando le condizioni climatiche lo consentano; sembra, infatti, che condizioni ambientali sfavorevoli abbiano un importante ruolo nella ripresa della vita parassitaria.

Le larve L₃ possono poi infestare l'ospite non solo per ingestione, ma anche per via transcutanea: nel punto di entrata si creano lesioni eritematose spesso gravi che si traducono in zoppie. Analogamente a quanto succede poi per *Bunostomum*, il parassita raggiunge la sua sede definitiva (in questo caso principalmente digiuno e tratto prossimale dell'ileo) attraverso una complessa migrazione che lo porta dal punto di penetrazione al circolo polmonare, dove abbandona il letto vascolare per risalire attraverso il parenchima polmonare e l'albero respiratorio fino in faringe ed essere quindi deglutito; raggiunge così l'apparato digerente e qui aderisce alla mucosa



causando enteriti catarrali con alterazione della capacità digestiva e deficit d'assorbimento.

I sintomi sono, ancora una volta, decisamente aspecifici: diarrea, disoressia/anoressia, abbattimento, dimagrimento e calo dell'incremento ponderale.

Figura 12: ciclo biologico di *Strongyloides spp.* (Univ. Peruana C. Heredia, Facultad de Med. Vet.)

· ***Nematodirus***

La maturazione delle larve del genere *Nematodirus* richiede delle condizioni climatiche ben precise, che rendono questa parassitosi più frequente nelle zone a clima temperato. Gli adulti, infatti, localizzati nell'intestino tenue producono uova che sviluppano in non meno di tre settimane a 20-22°C e addirittura in 2-3 mesi se le temperature sono inferiori.

Tali uova sono di dimensioni doppie rispetto a quelle degli altri strongili e contengono blastomeri meno numerosi e di colore decisamente scuro; questo aspetto caratteristico le rende le sole differenziabili da quelle di altri generi senza bisogno di ricorrere alla coprocultura.

Altra peculiarità del genere *Nematodirus* è rappresentata dal fatto che la larva abbandona l'uovo solo dopo lo sviluppo a L₃; il tempo che intercorre tra il raggiungimento di questo stadio larvale e la schiusa è variabile a seconda della specie, ma di certo questo particolare ciclo biologico rende il parassita decisamente più protetto da condizioni climatiche avverse, tanto che alcune specie possono sopravvivere sul pascolo fino a due anni all'interno dell'uovo.

Una volta ingerite, le larve aderiscono alla mucosa intestinale erodendo i villi e approfondendosi negli strati cellulari; nelle infestazioni da *Nematodirus* sono, infatti, proprio le larve del parassita le principali responsabili dell'azione patogena nei confronti dell'organismo ospite.

Questo fa sì che la fase acuta della malattia si manifesti, come avviene per *Oesophagostomum*, durante il periodo di prepatenza, complicando non poco la diagnosi, dal momento che in questa fase l'animale parassitato non alberga individui sessualmente maturi, pertanto l'esame copromicroscopico risulterà negativo.

A carico dell'intestino si osservano quindi gravi fenomeni di atrofia ed alterazione della capacità di assorbimento che si traducono in diarrea ad esordio acuto e rapida disidratazione, soprattutto nei soggetti più giovani.

· ***Trichostrongilus***

Le specie capaci di parassitare i bovini sono *T. colubriformis* e *T. axei*, che rappresenta un'eccezione rispetto agli altri SGI dal momento che è l'unico capace di parassitare un'ampia varietà di specie ospite (grandi e piccoli ruminanti, equini e suini).

T. axei si localizza a livello abomasale nei ruminanti o nello stomaco degli altri ospiti, mentre *T. colubriformis* colonizza il primo tratto dell'intestino tenue occupando quindi il duodeno.

Le ridotte dimensioni di questo parassita (meno di 7 mm di lunghezza) e l'aspetto decisamente sottile lo rendono difficilmente osservabile a occhio nudo.

Gli adulti sono sprovvisti di una capsula buccale; i maschi sono dotati di borsa copulatoria, due corti spicoli e gubernaculum, mentre le femmine presentano una porzione caudale corta e priva di flap vulvare.

Le larve maturano rapidamente a 22-24°C ma sviluppano anche a temperature decisamente inferiori e resistono bene sia al clima invernale che a quello estivo. Dopo essere state ingerite, le L₃ di *T. axei* aggrediscono la mucosa abomasale causando danni sovrapponibili a quelli indotti da *Ostertagia*, con aumento del pH, alterazione della permeabilità mucosale, lesioni nodulari e conseguente alterazione della capacità digestiva, perdita d'importanti quote proteiche, diarrea e dimagrimento.

T. axei però, diversamente da *Ostertagia*, non penetra nel lume delle ghiandole gastriche, bensì tra una ghiandola e l'altra generando lesioni che tendono a confluire in placche o lesioni ad anello.

Nel caso di *T. colubriformis* le forme infestanti L₃ arrivano a livello intestinale e qui penetrano nella mucosa, fino a raggiungere la lamina propria. In questa sede il parassita completa il proprio sviluppo e cresce quindi fino a determinare la rottura della mucosa emergendo, una volta maturo, nel lume intestinale. Ciò determina importanti perdite ematiche in caso d'infestazioni massive ed enteriti che si manifestano con diarrea, perdite di peso evidenti ed erosioni che però risultano macroscopicamente visibili solo laddove i parassiti sono ammassati in un'area limitata.

2.5. Diffusione in Italia

Nonostante l'importanza che le SGI rivestono nell'allevamento dei bovini, sia in termini di diffusione che di danni ad esse legati (Ambrosi, 1995), in Italia e in particolare nel nord est del nostro Paese le indagini sono scarse e spesso poco recenti. Le prevalenze variano in relazione alla tipologia di allevamento; ad esempio, valori del 64% sono segnalati nei bovini che frequentano i pascoli, mentre percentuali dal 6 al 18% vengono riscontrate in animali allevati con metodo intensivo o alla posta.

Per quanto riguarda i bovini da latte, le informazioni disponibili risalgono agli anni '90 (eccezion fatta per Zanutto *et al.* (2011) e Ruggeri *et al.*, 2012), ed evidenziano prevalenze maggiori negli allevamenti che praticano il pascolo, confermando che questo costituisce il principale fattore di rischio per l'insorgenza della parassitosi.

I dati forniti dagli studi di Poglayen *et al.* (1995) su bovini in alpeggio in tre diversi comprensori del Trentino testimoniano la presenza di questi elminti nell'81,9 % degli allevamenti controllati, con una prevalenza del 36% dei capi.

Analogamente, indagini svolte da Pietrobelli *et al.* (1988) in Friuli Venezia Giulia riportano la presenza di SGI in dieci delle dodici aziende controllate e complessivamente il 57,21% di animali parassitati.

L'importante ruolo del pascolo nell'epidemiologia della parassitosi è sottolineato anche dalle indagini di Capelli *et al.* (1993) svolte su bovini della provincia di Trento: la prevalenza delle SGI passa dal 54% al 76% al ritorno dall'alpeggio in autunno.

Studi eseguiti da Pietrobelli *et al.* (1988) in Friuli Venezia Giulia rilevano la presenza di SGI in dieci delle dodici aziende controllate ed il 57,21% degli animali parassitati.

Le informazioni riguardanti i bovini da carne, invece, sono limitate principalmente ai soggetti importati da diversi Paesi Europei (Zatti e Morganti, 1973; Stancampiano *et al.*, 2007).

Un quadro piuttosto completo e recente della diffusione delle SGI nei bovini dell'Appennino meridionale è disponibile on line (http://www.parassitologia.unina.it/CreMoPAR/mappe/bovini_appennino_meridionale.pdf) dal CREMoPAR (Centro Regionale per il Monitoraggio delle Parassitosi, Università di Napoli "Federico II"), con risultati riguardanti indagini condotte su 81 allevamenti e 975 animali. In tali indagini sono state evidenziate positività per allevamento e per capi rispettivamente del 92,6% e 50,2% per SGI, con valori del 16% e 2,7% per *Nematodirus* spp., e del 2,5% e 0,4% per *Strongyloides* spp.

2.6. Patogenesi e sintomatologia

L'azione patogena del parassita varia a seconda del genere e della specie.

In generale, tutti gli SGI esercitano, nei confronti dell'ospite, un'azione depauperativa tanto più marcata quanto maggiore è il grado d'infestazione; essa si esplica sia attraverso la sottrazione diretta di nutrienti da parte degli elminti, sia indirettamente

attraverso la perdita di sostanze nutritive lungo il tratto gastroenterico, conseguenza dell'infiammazione e del danno indotto dalla parassitosi.

A questo si associa l'azione disoressico-anoressica generata dal parassita: i cataboliti prodotti dagli elminti comportano, infatti, un'importante perdita di appetito nell'ospite, che può ridurre l'ingestione volontaria facilmente del 20%, toccando però anche percentuali maggiori nelle infestazioni massive. La differenza d'incremento ponderale registrata, tra vitelli parassitati e non, va dal 5% fino ad un massimo del 20-22% (Ambrosi, 1995).

I prodotti d'escrezione e gli stessi parassiti sono inoltre responsabili di un marcato effetto dismetabolizzante.

Nel caso degli strongili a localizzazione abomasale (primo tra tutti *O. ostertagi*) si riscontrano importanti alterazioni a carico dell'organo e dei processi fisiologici di cui esso è normalmente sede: la presenza del parassita e spesso delle larve ipobiotiche compromette drasticamente la funzionalità delle ghiandole gastriche traducendosi in una ridotta secrezione di acido cloridrico e nell'innalzamento del pH che favorisce la sovraccrescita della flora batterica intestinale; ciò, insieme ai fenomeni irritativi che colpiscono la mucosa intestinale, causa malassorbimento e diarrea.

Si osserva inoltre un aumento considerevole dei livelli di gastrina, conseguenza della mancanza del feedback negativo generato normalmente dall'acidità gastrica. Tale fenomeno si traduce nell'alterazione della normale motilità reticolo-ruminale, rallentamento dello svuotamento abomasale con stasi delle ingesta e conseguente calo dell'ingestione volontaria.

Allo stesso tempo, gli elevati livelli ematici di gastrina sarebbero anche, almeno in parte, responsabili dell'ipertrofia della mucosa fundica osservabile in queste parassitosi. Le infestazioni da *Ostertagia* sono state inoltre associate a pesanti alterazioni della digestione proteica (riconducibile alla mancata secrezione di pepsina provocata soprattutto dal danno indotto dalle larve ipobiotiche alle ghiandole gastriche) e aumentata perdita di albumine lungo il tratto gastrointestinale.

Da ciò derivano sia una ridotta deposizione di proteine a livello muscolare che un tentativo da parte del fegato di compensare il deficit proteico aumentando il tasso di sintesi epatica, mentre il ricorso alla mobilitazione delle riserve adipose corporee

giustifica l'aumento della concentrazione di acidi grassi non esterificati nel torrente ematico (Fox, 1993).

La composizione delle carcasse degli animali parassitati riflette le alterazioni appena descritte: un aumento del contenuto di acqua a scapito del tenore proteico e lipidico sono stati evidenziati al momento della macellazione non solo di soggetti clinicamente infestati ma anche degli animali in cui erano assenti i segni clinici della malattia (Xiao *et al.*, 1992).

Le migrazioni larvali previste dal ciclo biologico di questi elminti sono responsabili di un'azione traumatica che si somma a quella generata dal parassita adulto sulla mucosa del tratto gastroenterico. Tale azione è, ancora una volta, particolarmente marcata nelle infestazioni da *Ostertagia*, causa di gravi abomasiti che possono colpire gli animali sia dopo l'inizio della stagione di pascolo fino alla tarda estate, a seguito dell'ingestione delle forme infestanti presenti nell'ambiente (ostertagiosi I), sia nel tardo inverno, per maturazione delle larve ipobiotiche annidate nella mucosa abomasale (ostertagiosi II).

I generi *Haemoncus* e *Bunostomum* possiedono una spiccata attività ematofagica e questo giustifica i quadri di anemia anche gravi che possono insorgere rapidamente negli animali gravemente parassitati da questi strongili. In realtà però anche elminti non ematofagi in senso stretto, come *Chabertia* ed *Oesophagostomum*, sono responsabili di erosioni ed ulcere mucosali che comportano perdite ematiche più o meno evidenti a seconda del grado d'infestazione.

Ciò, associato alla perdita di proteine lungo il tratto gastroenterico può tradursi, nei casi più gravi, in una marcata ipoproteinemia, fino ad arrivare all'inversione del rapporto albumine-globuline con formazione di edemi, come il caratteristico "bottle-jaw" sottomandibolare, tipico della Haemoncosi (Ambrosi, 1995).

Altro comparto fortemente intaccato dalla parassitosi è quello della produzione latte: sebbene i molti studi e dati a riguardo non siano sempre concordi, si stima una perdita giornaliera di 0.35 kg di latte per vacca parassitata (Sanchez *et al.*, 2004; Vanderstichel *et al.*, 2013), arrivando ad un calo complessivo superiore al 10% sull'intera lattazione. Quest'ultima viene compromessa non solo in termini quantitativi ma anche qualitativi, vista la pari perdita complessiva in grasso, la diminuzione del residuo secco e del contenuto proteico osservati (soprattutto caseina) (Ambrosi, 1995).

Bisogna poi ricordare che i cataboliti escreti dal parassita esercitano nei confronti dell'ospite un'importante azione di tipo tossico che si ripercuote soprattutto sul fegato, sovraccaricato già dall'aumentata mobilizzazione di lipidi, compromettendone la funzionalità e aggravando ulteriormente le alterazioni già presenti a carico del metabolismo proteico sopra citate.

Infine per quei generi che, come *Bunostomum* e *Strongyloides*, possono infestare l'ospite anche per via transcutanea non bisogna dimenticare che le lesioni generate dalla penetrazione del parassita rappresentano una via d'accesso privilegiata per l'irruzione di patogeni secondari. Questi possono risalire fino a raggiungere il circolo e sono spesso causa di zoppie anche gravi.

Da quanto appena descritto appare chiaro che i sintomi generati dalla parassitosi sono decisamente aspecifici e, sebbene alcuni strongili siano responsabili di determinate azioni patologiche piuttosto che di altre, non è possibile risalire al genere parassitario semplicemente sulla base dei segni clinici manifestati dall'animale, soprattutto alla luce della condizione di poliparassitismo che rappresenta ormai la norma in Italia.

Infine un accenno alla mortalità: pur attestandosi attorno a valori decisamente bassi va ricordato che, sebbene ciò non costituisca la regola, cariche parassitarie particolarmente elevate possono mietere vittime, soprattutto tra i soggetti più giovani.

2.7. Diagnosi

Come già accennato, molti sono gli aspetti che complicano la diagnostica delle SGI.

Una diagnosi su base clinica risulta decisamente complicata, poiché i sintomi, laddove clinicamente evidenti, sono assolutamente aspecifici e sebbene possano far insorgere un sospetto diagnostico non sono comunque sufficienti a confermarlo.

Bisogna inoltre considerare che per quel fenomeno già descritto della “*self cure*”, gli ospiti riescono a contenere l'infestazione montando una risposta immunitaria capace di limitare il numero di parassiti che colonizza il tratto gastroenterico; così facendo non solo mantengono spesso la malattia su un piano subclinico, che pur non generando rilievi clinici negli animali ne compromette le *performances* produttive, ma abbassa anche le cariche parassitarie fino a livelli tali da sfiorare i limiti di sensibilità di diverse tecniche diagnostiche.

Ciò premesso, è possibile passare in rassegna le principali metodiche ad oggi utilizzate.

2.7.1. Esame coprologico

L'esame delle feci rappresenta forse la principale tecnica diagnostica attualmente adottata per la diagnosi di SGI.

Si tratta infatti di una metodica che ha trovato largo impiego grazie alla sua rapidità e relativa facilità d'esecuzione.

L'esame copromicroscopico può essere sia di tipo qualitativo che quantitativo; in entrambi i casi, il materiale da cui si parte è rappresentato da un campione individuale di feci.

E' preferibile che questo venga prelevato direttamente dall'ampolla rettale e che tra il campionamento e le indagini di laboratorio trascorra il minor tempo possibile, questo perché lo sviluppo delle larve nell'ambiente può essere molto rapido e potrebbe quindi falsare il risultato.

Sia l'esame copromicroscopico qualitativo che quello quantitativo consistono essenzialmente in un esame per flottazione; le uova di strongili sono tutte piuttosto leggere ed è sufficiente l'utilizzo di una soluzione a peso specifico 1300.

2.7.1.1. Esame copromicroscopico qualitativo

L'esame copromicroscopico qualitativo permette di rilevare o confermare la presenza del parassita senza ottenere però indicazioni circa il grado d'infestazione dei soggetti.

La metodica prevede di stemperare in un mortaio alcuni grammi di feci, prelevati dal campione, con dell'acqua; il composto così ottenuto viene filtrato e successivamente centrifugato per 3 minuti a 1500-2000 giri.

Si elimina il surnatante mantenendo solo il sedimento adeso al fondo della provetta; quest'operazione viene ripetuta più volte fino ad ottenere un surnatante limpido.

Dopo l'ultima centrifugazione si può quindi procedere all'aggiunta della soluzione ad alto peso specifico sul sedimento fino ad ottenere la formazione di un menisco convesso sporgente rispetto al bordo della provetta, sul quale si appoggia un vetrino coprioggetto. Lasciandolo riposare per alcuni minuti, le uova dei parassiti eventualmente presenti nel

campione affioreranno, aderendo al vetrino. Si poggia infine quest'ultimo ad un portaoggetto e si procede alla lettura al microscopio ottico a basso ingrandimento(10x). Le uova di strongili hanno un aspetto caratteristico (80 x 50 µm circa, eccezion fatta per *Nematodirus*, parete sottile trasparente che racchiude al suo interno i blastomeri) (Fig. 5), ma per arrivare ad una diagnosi di genere è necessario procedere con una coprocultura.

2.7.1.2. Esame copromicroscopico quantitativo

Questa metodica, rispetto alla precedente, consente non solo di accertare la presenza del parassita, ma anche di quantificare l'escrezione fecale di uova esprimendola con un valore u.p.g. (uova per grammo).

Il principio di base è lo stesso, vale a dire un esame per flottazione, con la differenza però che la lettura, questa volta, viene eseguita tramite l'utilizzo di un'apposita camera di conta, la camera di McMaster.

Si parte infatti da una quantità nota di feci che viene stemperata accuratamente in un mortaio con della soluzione ad alta densità e portata ad un volume di 30 ml in una provetta Falcon.

Si procede chiudendo la provetta e agitandola leggermente in modo da rendere il composto omogeneo.

Infine si preleva con una pipetta, cercando di essere piuttosto rapidi e servendosi di una garza come filtro per non aspirare le impurità, la quantità di fluido necessaria a riempire la camera di McMaster (Fig. 13).

Questa è costituita da due vetrini sovrapposti separati da una sottile intercapedine dello spessore di 1,5 mm; è all'interno di questo spazio che viene iniettata la sospensione ottenuta a partire dal campione preso in esame, avendo cura di evitare la formazione di bolle d'aria che ostacolerebbero la lettura.

Sul vetrino superiore sono disegnati due reticolati quadrati di 1 cm di lato ciascuno, pertanto il volume complessivo ad essi sotteso è di 0,30 ml (0,15 ml per ciascuno). Si lascia riposare per qualche minuto per consentire l'affioramento degli elementi parassitari.

Durante la lettura, vanno contate tutte le uova incluse all'interno delle griglie, mentre vanno escluse quelle che si trovano all'esterno dei reticoli, così da poter risalire al

numero di uova presenti nel volume di 0,3 ml e, attraverso un rapido calcolo, nota la quantità di feci da cui si è partiti, al valore u.p.g.

Non esiste purtroppo una correlazione matematica tra il valore che si ottiene con questa tecnica diagnostica ed il numero di parassiti effettivamente presenti nel tratto gastroenterico dell'ospite; questo perché, come già descritto, moltissimi sono i fattori capaci di regolare l'escrezione fecale di uova (stato immunitario e fisiologico dell'ospite, fattori nutrizionali ed endocrini, ecc...), condizionata peraltro anche dal fenomeno dell'ipobiosi e dalla prolificità caratteristica di ogni singolo genere.

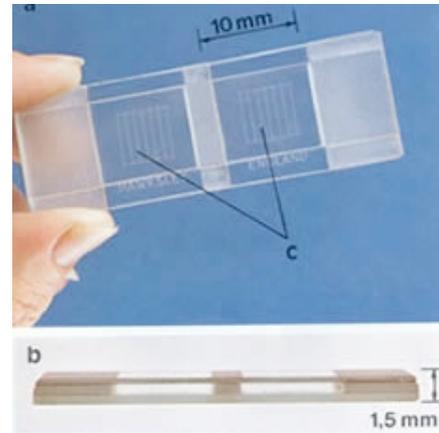


Figura 13: camera di McMaster.

In realtà entrambe le metodiche non sono esenti da criticità. Innanzitutto va ricordato che l'escrezione delle uova con le feci non è costante nel tempo e che l'elevato volume fecale dei bovini ha un effetto di diluizione tale sugli elementi parassitari da esporre al rischio di false negatività.

Altro aspetto decisamente problematico è quello legato al periodo di prepatenza e all'ipobiosi: l'esito negativo che l'esame coprologico fornisce in entrambi questi casi è, in realtà, il risultato dell'assenza di parassiti sessualmente maturi e capaci di produrre uova in animali che però sono, a tutti gli effetti, infestati.

Nonostante i suoi aspetti critici, l'esame copromicroscopico rimane un importante strumento diagnostico, che utilizzato come parametro di riferimento per individuare gli animali da trattare offre ottimi riscontri sulle *performances* zootecniche (Mejia *et al.*, 2011) e consente di intervenire selettivamente sui soli animali effettivamente parassitati.

2.7.2. Dosaggio del pepsinogeno

Il dosaggio dei livelli sierici di pepsinogeno risulta utile soprattutto per la diagnosi di ostertagiosi, poiché l'aumento di questo enzima è espressione di danno abomasale, tipico esito di un'infestazione sostenuta dal genere *Ostertagia*.

La mancata conversione del pepsinogeno in pepsina, dovuta all'innalzamento del pH gastrico, associata a un'alterazione della permeabilità mucosale si traduce, infatti, nel

passaggio in circolo di questo enzima con conseguente aumento della sua concentrazione ematica.

I risultati vengono espressi in unità di tirosina.

2.7.3. Dosaggio degli anticorpi contro *Ostertagia*.

La valutazione del titolo anticorpale rappresenta un'altra tecnica diagnostica che fino ad oggi ha però trovato applicazione prevalentemente nei confronti di *O. ostertagi*. E' infatti disponibile un kit ELISA per la determinazione, sia nel siero che nel latte, degli anticorpi verso questa specie, i cui risultati vengono espressi in termini di densità ottica.

Tale misurazione risulta vantaggiosa per la sua rapidità e per la possibilità di essere eseguita direttamente sul latte di massa; tuttavia, se effettuata su campioni individuali, questa metodica consente sia di ottenere informazioni decisamente più precise circa lo *status* parassitario dell'intera mandria sia di impostare un trattamento selettivo nei confronti dei soggetti maggiormente infestati, fermo restando che la correlazione tra il titolo anticorpale e la risposta produttiva al trattamento è ancora dibattuta (Charlier *et al.*, 2009; Charlier *et al.*, 2010, Forbes *et al.*, 2008, Sanchez *et al.*, 2004).

E' chiaro che la presenza di anticorpi testimonia l'avvenuto contatto dell'individuo con il parassita senza però che questo sia necessariamente ancora presente nell'ospite al momento del prelievo; i risultati dei test individuali vanno perciò interpretati alla luce della storia del singolo animale e del numero di lattazioni.

2.8. Terapia e controllo

2.8.1. Farmaci antielmintici

Per lungo tempo, il trattamento farmacologico ha rappresentato l'unico strumento utilizzato dagli allevatori nella lotta alle SGI. Questi lo hanno adoperato con un duplice impiego, sia di tipo terapeutico, vale a dire negli animali con diagnosi di SGI, sia di tipo profilattico, con dei trattamenti strategici programmati nel corso dell'anno sull'intera mandria, allo scopo di ridurre la circolazione degli elminti circolanti ed abbassare il rischio parassitario.

Le principali categorie farmacologiche impiegate nei confronti di queste elmintiasi sono rappresentate da tre classi di antielmintici:

1. Benzimidazolici e probenzimidazolici;
2. Imidazotiazolici e tetraidropirimidine;
3. Lattoni Macro ciclici.

BENZIMIDAZOLICI E PROBENZIMIDAZOLICI

I benzimidazolici e i probenzimidazolici costituiscono i cosiddetti antielmintici ad ampio spettro “di seconda generazione”.

A partire dagli anni '60, infatti, questi composti sono andati progressivamente a sostituire quegli antielmintici definiti “di prima generazione”, comparsi sul mercato dagli anni '30; prima in questa categoria è stata la fenotiazina, molecola tutt'ora in uso, caratterizzata però da un basso indice di sicurezza e da effetti secondari di fotosensibilizzazione e colorazione rossa degli escreti che ne hanno limitato il successo. E' stata invece la sua associazione alla piperazina a rappresentare per decenni il migliore strumento nella lotta alle elmintiasi; questo principio, infatti, sebbene non costituisca di per se' un antielmintico ad ampio spettro perché attivo quasi esclusivamente nei confronti degli Ascaridi, vanta un importante effetto sinergico se utilizzato in associazione alla fenotiazina (Ambrosi, 1995).

Alla classe dei benzimidazolici appartengono molti principi attivi: capostipite della categoria fu il tiabendazolo, a cui ben presto si affiancarono l'albendazolo, il fenbendazolo, l'oxfendazolo e il mebendazolo, che hanno trovato largo impiego come antielmintici, ma anche l'ossibendazolo e il parbendazolo.

L'efficacia di queste molecole nei confronti dei diversi generi di SGI può essere definita equiparabile, pur con qualche eccezione (ad esempio il tiabendazolo risulta meno efficace nei confronti di *Bunostomum*) che comunque non influenza in maniera rilevante la scelta di un antielmintico piuttosto che di un altro.

Tra i probenzimidazolici, qui inclusi nella categoria perché metabolizzati dall'organismo ospite a molecole benzimidazoliche farmacologicamente attive, troviamo invece il febantel, il netomibin ed il tiofanato.

Il meccanismo d'azione di questo gruppo di farmaci consiste nel legame alla beta-tubulina, proteina responsabile della polimerizzazione dei microtubuli, organelli

intracellulari coinvolti in diversi processi tra cui il trasporto di svariate sostanze all'interno della cellula (compreso il glucosio) e la mitosi.

I benzimidazolici sono inoltre in grado di inibire la fumarato-reduttasi, enzima implicato nella catena respiratoria mitocondriale; da tutto ciò deriva un blocco del metabolismo energetico del parassita che va incontro a morte nel giro di qualche giorno dalla somministrazione.

Il meccanismo d'azione selettivo di questi farmaci fa sì che siano ben tollerati dall'organismo ospite e che possano quindi essere impiegati con sicurezza anche in soggetti malati o gravemente debilitati; alcuni tuttavia vanno evitati in prossimità del concepimento perché teratogeni essi stessi o i metaboliti che da essi originano (Urquhart, 1998).

Sono disponibili sul mercato sotto forma di formulazioni da somministrare generalmente *per os* (Genchi, 2008). Infine, la loro azione si esplica non solo nei confronti delle forme adulte ma anche delle larve e delle uova.

IMIDAZOTIAZOLICI E TETRAIDROPIRIMIDINE.

Anche gli imidazotiazolici e le tetraidropirimidine appartengono alla “seconda generazione” di antielmintici ad ampio spettro.

Gli imidazotiazolici comprendono due principi attivi: il levamisolo e il tetramisolo.

Il primo rappresenta l'isomero levogiro del secondo e la sua maggior maneggevolezza l'ha reso di gran lunga preferibile al tetramisolo, che è stato così da questo sostituito.

Il levamisolo agisce da agonista dei recettori colinergici; si lega ai recettori nicotinici delle cellule muscolari dei Nematodi simulando l'azione dell'acetilcolina e causando paralisi spastica del parassita, che viene così espulso con la normale peristalsi.

A concentrazioni elevate, il levamisolo è inoltre capace di inibire la fumarato-reduttasi, analogamente ai benzimidazolici, causando il blocco del ciclo di Krebs e drastico calo della produzione di ATP.

A basse dosi, invece, stimola l'immunità cellulo-mediata e quella umorale, effetto particolarmente evidente nei soggetti anziani e/o immunodepressi.

Il levamisolo è efficace sia contro gli SGI che quelli broncopolmonari (SBP), attivo sia nei confronti degli adulti che degli stadi larvali, ma privo di attività ovicida.

Sebbene sia più maneggevole del tetramisolo, questo farmaco presenta comunque un basso indice terapeutico rispetto ai benzimidazolici e in caso di sovradosaggio compaiono i tipici sintomi riconducibili ad una intensa stimolazione colinergica: vomito, scialorrea, diarrea, tremori muscolari, broncospasmo...

Sono disponibili sul mercato formulazioni da somministrare *per os*, per via parenterale (sottocute, è irritante per via intramuscolare) e prodotti spot on.

Al gruppo delle tetraidropirimidine appartengono invece il pyrantel ed il suo metilestere, il morantel. Si tratta di molecole attive nei confronti della maggior parte dei Nematodi gastrointestinali, efficaci soprattutto contro gli stadi adulti, meno verso le forme immature.

Il meccanismo d'azione è del tutto analogo a quello degli imidazotiazolici, ma la potenza di questi farmaci è maggiore sia di quella del ligando naturale che del levamisolo. Si legano infatti ai recettori colinergici generando un'azione contratturante ad insorgenza lenta ma più potente e duratura (fino a 100 volte) di quella indotta dall'acetilcolina.

Entrambi vengono somministrati per via orale sotto forma di sali: pamoato o tartrato per il pyrantel, fumarato o tartrato per il morantel.

Quest'ultimo, con una DL_{50} *per os* pari a 5 g/kg, rappresenta la tetraidropirimidina più sicura, tuttavia anche il pyrantel dimostra bassa tossicità e può essere utilizzato anche in soggetti giovani o animali gravidi; va invece evitato in individui particolarmente debilitati, in cui gli effetti legati alla stimolazione dei recettori nicotinici potrebbero essere più marcati e pericolosi.

LATTONI MACROCICLICI

I lattoni macrociclici rappresentano la classe farmacologica maggiormente utilizzata nel trattamento delle elmintiasi degli animali da reddito sostenute da Nematodi.

Questa denominazione comprende in realtà due distinte famiglie: le avermectine (ivermectina, abamectina, doramectina, eprinomectina e selamectina) e le milbemicine (moxidectina e milbemicina ossima).

Si tratta di principi attivi dotati di elevata attività non solo nei confronti dei Nematodi, sia allo stadio adulto che larvale, ma anche di molti Artropodi parassiti, a dosi estremamente basse.

Per questo motivo, per indicare questa categoria di farmaci, che rappresentano i più recenti tra gli antelmintici finora descritti, è stato coniato il termine “endectocidi” (Genchi, 2008).

Le avermectine fecero per la prima volta la loro comparsa agli inizi degli anni '80, quando, a partire dal batterio *Streptomyces avermitilis* venne isolata l'abamectina e da questa, per via sintetica, l'ivermectina e, più tardi, l'eprinomectina; quest'ultima, grazie al suo bassissimo indice di ripartizione plasma/latte, è l'unica molecola appartenente ai lattoni macrociclici autorizzata per i bovini in lattazione.

A ruota seguirono poi tutte le altre.

Le milbemicine vennero isolate prima delle avermectine: pioniera fu la milbemicina ossima nel 1967, estratta da *Streptomyces hygroscopicus*, affiancata, nel 1983, dalla nemadectina, isolata da *Streptomyces cyaneogriseus*, a partire dalla quale venne poi sintetizzata la moxidectina (Prichard *et al.*, 2012).

Avermectine e milbemicine possiedono una struttura di base comune che sostanzialmente differisce solo per il disaccaride in posizione C₁₃ dell'anello, assente nelle milbemicine.

In entrambi i casi si tratta comunque di molecole altamente liposolubili, che tendono ad accumularsi nel fegato e nel tessuto adiposo per andare poi incontro a redistribuzione, fenomeno che spiega la prolungata attività di questi composti (Urquhart, 1998).

Il meccanismo d'azione dei lattoni macrociclici risiede nella capacità di queste molecole di legarsi con elevata affinità e in maniera irreversibile ai recettori canale del cloro glutammato-dipendenti presenti nelle cellule nervose e muscolari degli invertebrati.

Ne deriva l'apertura del canale con conseguente afflusso incontrollato dell'elettrolita all'interno della cellula, che ne determina l'iperpolarizzazione. Il risultato è il blocco della trasmissione dell'impulso con paralisi flaccida e morte del parassita, che viene successivamente espulso con la normale peristalsi.

Altro bersaglio di queste molecole è rappresentato, inoltre, dai recettori canale del cloro GABA-dipendenti, ai quali però si legano reversibilmente e con un'affinità circa 100 volte inferiore, causando perciò una paralisi reversibile (Genchi, 2008).

Il GABA costituisce il principale neurotrasmettitore inibitorio sia nei Mammiferi che nei Nematodi e gli Artropodi; tuttavia, mentre in questi ultimi due *phyla* i suoi recettori si trovano principalmente nel Sistema Nervoso Periferico, nei Mammiferi essi sono

localizzati nel Sistema Nervoso Centrale. La presenza della barriera ematoencefalica impedisce a queste molecole di raggiungere, in questo sito, concentrazioni tali da determinare tossicità e giustifica la relativa sicurezza con cui esse possono essere adoperate per il trattamento di animali da reddito e da compagnia (salvo alcune eccezioni, quali i cani di razza Collie). La presenza, infatti, di pompe di efflusso, tra le più importanti la glicoproteina P, proteina transmembranaria espressa non solo a livello di barriera ematoencefalica ma anche in sede epatica ed intestinale (Lifschitz *et al.*, 2010), impedisce al farmaco di accumularsi in questo distretto.

I lattoni macrociclici, se utilizzati alle dosi consigliate, sono dunque molto sicuri nella maggior parte delle specie e reazioni avverse, quali vomito, diarrea, anoressia, letargia e tremori muscolari, possono essere attribuite a sovradosaggio.

Il GABA non agisce invece da neurotrasmettitore né nei Trematodi né nei Cestodi, pertanto questi farmaci non sortiscono effetto nelle parassitosi sostenute da tali elminti.

I lattoni macrociclici sono presenti sul mercato in diverse formulazioni e come prodotti registrati per le diverse specie: preparazioni ad uso orale per gli equidi, iniettabili (principalmente sottocute) e pour-on per i bovini, ecc..., ma anche compresse e tavolette masticabili per gli animali da compagnia, a testimonianza dell'enorme diffusione di questa classe di antelmintici.

2.8.2. Chemioresistenza

Per diversi prodotti antelmintici, nel corso degli anni, si è cominciata ad osservare una perdita di efficacia nei confronti delle specie parassitarie verso le quali questi erano normalmente impiegati; tale fenomeno è chiaro indice della capacità acquisita da questi elminti di resistere a tali farmaci e si può dunque parlare di chemioresistenza ogni volta che, in una popolazione, il numero di individui che riesce a tollerare un composto è più elevato che in una normale popolazione della stessa specie (Prichard *et al.*, 1980).

Tale fenomeno è il frutto della pressione selettiva esercitata dai ripetuti trattamenti antelmintici ed essendo la resistenza un carattere ereditabile, appare chiaro come essa modifichi la composizione della popolazione parassitaria aumentando progressivamente la frazione di soggetti resistenti.

Le prime segnalazioni di antelmintico-resistenza risalgono ai tardi anni '50 - primi anni '60 e riguardano la fenotiazina, principale rappresentante della prima generazione di antelmintici ad ampio spettro; ceppi di *H. contortus* e successivamente Ciatostomi resistenti vennero isolati rispettivamente da ovini ed equini.

Ben presto il problema si estese però anche agli antelmintici di seconda generazione, con segnalazioni circa l'inefficacia di molecole benzimidazoliche, tra la fine degli anni '60 e la metà degli anni '70, nei confronti di altri Nematodi della specie ovina, *T. circumcincta* e *Tr. colubriformis*.

Lo stesso si ripeté negli anni successivi a seguito dell'immissione in commercio di tetraidropirimidine e imidazotiazolici, fino ad arrivare all'inizio degli anni '80 ai primi casi riguardanti i lattoni macrociclici.

Sempre agli anni '80 risalgono anche le prime segnalazioni di resistenza crociata a principi attivi appartenenti a classi farmacologiche differenti, indice della rapida espansione e della crescente gravità del problema (Kaplan, 2004).

Va infatti sottolineato che una volta stabilitasi la resistenza in una popolazione, non è mai stata osservato un vero e proprio ritorno di quest'ultima allo stato di suscettibilità (Wolstenholme *et al.*, 2004; Kaplan, 2004; Sangster *et al.*, 2002; Palcy *et al.*, 2010); di conseguenza le probabilità che il fenomeno, una volta instauratosi, regredisca sono decisamente ridotte. Altro elemento piuttosto preoccupante è l'isolamento di un ceppo di *C. oncophora* resistente all'ivermectina con caratteristiche di patogenicità decisamente maggiori dei comuni ceppi sensibili al principio attivo (Kaplan, 2004).

Va inoltre chiarito che la chemioresistenza, sebbene studiata in maniera particolarmente approfondita negli ovini, dove peraltro ha raggiunto proporzioni ormai drammatiche, di certo non riguarda solo questa specie. Per lungo tempo sono mancati studi approfonditi sui bovini, per i quali spesso ci si limitava a segnalazioni su base clinica, che tuttavia risultano assolutamente insufficienti ed inadeguate in quanto evidenze cliniche si ottengono solo quando la resistenza nella popolazione raggiunge livelli molto elevati.

Le segnalazioni nell'allevamento bovino non sono dunque abbondanti quanto quelle dei piccoli ruminanti; tuttavia negli ultimi anni è cresciuto progressivamente il numero di studi a riguardo in tutto il Mondo. In Argentina sono stati isolati parassiti delle specie *C. punctata*, *O. ostertagi* e *H. placei* resistenti al febendazolo, altri all'ivermectina, ma

anche individui di *C. oncophora* resistenti contemporaneamente anche ad entrambi questi principi attivi (Mejia *et al.*, 2003; Suarez *et al.*, 2006).

Altre segnalazioni di resistenza provengono dal Brasile e riguardano soprattutto *Cooperia spp.* e *Haemonchus spp.* e l'ivermectina, con evidenze però di scarsa efficacia anche per albendazolo e levamisolo (Soutello *et al.*, 2007). In Brasile i casi di antielmintico-resistenza riguardano tuttavia anche le milbemicine, in particolare la moxidectina, verso la quale sono stati isolati ceppi di *Cooperia spp.* e *Oe. radiatum* resistenti (Condi *et al.*, 2009).

In Belgio, Germania e Svezia l'efficacia dell'ivermectina è diminuita notevolmente verso *C. oncophora* e si è rivelata invece solo parziale nei confronti di *O. ostertagi* (Demeler *et al.*, 2009).

La chemioresistenza non risparmia neppure gli Stati Uniti, dove sono stati identificati esemplari di *H. placei* e *Cooperia* resistenti alle avermectine, ma anche di *H. contortus* resistenti sia ai lattoni macrociclici che ai benzimidazolici (Gasbarre *et al.*, 2009).

Infine, a confermare il carattere cosmopolita del fenomeno, le segnalazioni provenienti dalla Nuova Zelanda circa episodi di resistenza ai lattoni macrociclici soprattutto per *C. oncophora* e *Tr. longispicularis*.

Sebbene i meccanismi attraverso i quali la chemioresistenza può instaurarsi siano in realtà limitati (Wolstenholme *et al.*, 2004), non per tutte le classi farmacologiche coinvolte sono chiare le basi del fenomeno.

Conoscenze decisamente approfondite sono disponibili per i benzimidazolici: le basi genetiche della resistenza nei confronti di questi farmaci sono state identificate in diversi polimorfismi della beta-tubulina, molecola target del farmaco, senza escludere comunque anche un possibile ruolo delle pompe di efflusso (glicoproteine P) nei Tricostrongilidi (Wolstenholme *et al.*, 2004).

Ciò ha permesso di applicare la biologia molecolare per il riconoscimento dei ceppi resistenti, consentendo di utilizzare quindi un metodo rapido, affidabile e altamente ripetibile quale la PCR per la diagnosi (Elard *et al.*, 1999; Silvestre *et al.*, 2002; Alvarez-Sanchez *et al.*, 2005). Per i benzimidazolici sono, ad ogni modo, disponibili anche altri strumenti diagnostici quali il test di schiusa delle uova e quello di sviluppo

larvale in agar (che però non è stato ancora appositamente studiato per l'applicazione ai Nematodi della specie bovina e suina) (Coles *et al.*, 2006).

Lo stesso non si può dire, purtroppo, per le altre classi di antelmintici e in particolare per i lattoni macrociclici (categoria a cui appartengono proprio le due molecole testate nel presente studio). Esistono, infatti, studi che indagano le basi della resistenza in questi farmaci e che ne hanno riconosciuto possibili meccanismi: polimorfismi nei geni codificanti per i canali del cloro glutammato o GABA-dipendenti e la sovraespressione dei trasportatori ABC, in particolare della glicoproteina P (Blackhall *et al.*, 1998; Von Samson-Himmelstjerna, 2006; Wolstenholme *et al.*, 2004; Prichard *et al.*, 2007; Lifschitz *et al.*, 2010; Lespine *et al.*, 2012; Areskog *et al.*, 2013; Demeler *et al.*, 2013) sembrano essere, ad oggi, i principali responsabili. Tuttavia queste conoscenze non sono risultate sufficienti per l'elaborazione di prove molecolari quali quelle sviluppate per i benzimidazolici ed il test di riduzione dell'escrezione fecale di uova (FECRT) rimane tuttora l'unico strumento soddisfacente per la diagnosi di resistenza ai lattoni macrociclici (Coles *et al.*, 2006).

Il presente studio si è servito proprio di questa prova in vivo ed ha applicato il protocollo fornito dalla W.A.A.V.P.; questa, infatti, ha elaborato delle linee guida dettagliate allo scopo di standardizzare le principali metodiche volte all'identificazione dell'antelmintico-resistenza (Coles *et al.*, 1992), concentrandosi fin da subito proprio sul FECRT, perché applicabile a tutte le categorie di antelmintici e di semplice esecuzione.

2.8.3. Piani di lotta

Alla luce di quanto discusso finora, appare chiaro che non è assolutamente consigliabile e tantomeno saggio impostare l'intera lotta alle SGI esclusivamente attorno all'intervento farmacologico.

E' necessario invece avviare piani di lotta integrata che associno al trattamento antelmintico un'adeguata gestione dell'allevamento ed interventi ambientali volti a ridurre il minimo il rischio d'infestazione.

Tali piani di lotta integrata comprendono dunque:

- stabilire con cura il carico di bestiame per unità di superficie; il sovraccarico dei pascoli comporta, infatti, un'elevata contaminazione degli stessi con le larve escrete dai soggetti infestati;
- effettuare la rotazione dei pascoli; sarebbe buona norma suddividere il terreno in un numero di parcelle sufficienti ad una rotazione che consenta di far permanere gli animali nello stesso spazio per un tempo inferiore a quello medio di sviluppo delle forme infestanti. Laddove questo non fosse possibile è comunque buona norma non far permanere i soggetti nella stessa area troppo a lungo o farli ritornare sullo stesso pascolo in tempi troppo ravvicinati;
- alternare, se possibile, sullo stesso pascolo diverse specie (bovini-ovini), sfruttando la specie-specificità degli SGI;
- evitare la promiscuità sui pascoli con altri allevamenti, se non previa disinfezione degli stessi con prodotti attivi contro le larve (ad es. calciocianamide);
- sarebbe inoltre opportuno evitare la promiscuità di capi al primo pascolo con i soggetti adulti, allo scopo di evitare il contatto di animali ancora “vergini” con un elevato grado di contaminazione;
- adottare un ritmo di pascolo giornaliero che consenta di ridurre il rischio d'infestazione degli animali, evitando quindi l'uscita precoce al mattino e il rientro tardivo alla sera, quando l'umidità e l'assenza della radiazione solare diretta offrono condizioni ottimali per la sopravvivenza e la vitalità delle larve.
- adottare una buona cura agronomica del pascolo (aratura profonda in caso di rinnovo dei pascoli, drenaggio delle acque stagnanti, riposo annuale...) ed evitare, allo stesso tempo, di condurre gli animali in quelle aree che offrono l'ambiente ideale allo sviluppo delle larve;
- procedere allo spandimento di deiezioni e liquami solo dopo un'adeguata maturazione, che consenta di inattivare le larve eventualmente presenti;
- sottoporre annualmente gli animali ad accertamenti diagnostici quali l'esame coprologico o eventualmente utilizzando i kit presenti sul mercato per i test sierologici.
- programmare interventi antielmintici strategici nel corso dell'anno: è bene effettuare un primo trattamento subito dopo il ristallo autunnale, al fine di

eliminare le forme adulte accumulate nella stagione di pascolo e limitare il fenomeno dell'ipobiosi. Un secondo trattamento va invece eseguito prima dell'uscita al pascolo, per eliminare i parassiti maturati dalle forme ipobiotiche che hanno completato il proprio sviluppo dopo la stagione invernale.

Accanto a questi, ovviamente, rimangono i trattamenti tattici, da intraprendere qualora si rilevi la presenza degli elminti in allevamento o siano presenti condizioni particolarmente favorevoli allo sviluppo della parassitosi;

- è eventualmente possibile anche ricorrere all'utilizzo di funghi nematofagi per la lotta biologica a questi elminti (Gronvold *et al.*, 1993);
- evitare fattori stressanti che possono deprimere il sistema immunitario degli animali rendendolo meno competente nel contrastare l'infestazione e fornire un adeguato apporto energetico e proteico, che è stato dimostrato stimolare l'immunità dell'ospite (Wolstenholme *et al.*, 2004);

E' bene ricordare inoltre che, sebbene questi parassiti interessino soprattutto animali che praticano il pascolo, possono infestare anche soggetti allevati in azienda; foraggi verdi o non adeguatamente stagionati e acque contaminate (Cringoli *et al.*, 2003) rappresentano un possibile vettore di forme infestanti da non sottovalutare. Inoltre non è pratica del tutto insolita quella di allevare le manzette al pascolo fino all'entrata in produzione; così facendo, al momento dell'introduzione in azienda, gli animali veicoleranno i parassiti potendo risultare quindi fonte d'infestazione per le vacche presenti in allevamento.

Buone pratiche di gestione dell'allevamento comprendono quindi:

- evitare la somministrazione di foraggi verdi preferendo l'utilizzo di insilati e affienati (che offrono condizioni decisamente sfavorevoli alla sopravvivenza del parassita);
- provvedere alla pulizia e all'igiene delle strutture, all'allontanamento delle deiezioni e ad un'adeguata gestione della lettiera soprattutto se permanente;
- evitare l'introduzione in azienda di animali di cui non si conosce lo stato sanitario, possibili portatori di Nematodi resistenti; sarebbe infatti buona norma trattare tali soggetti confinandoli in un paddock prima di inserirli nella mandria (Wolstenholme *et al.*, 2004);

E' ovviamente poco probabile pensare che ogni allevamento attui tutte le misure finora elencate per la lotta alle SGI; sarebbe tuttavia sufficiente mettere in atto anche le sole

misure minime, basandosi su un'analisi della situazione aziendale, per contrastare con successo la parassitosi (Battelli *et al.*, 1982).

3. MATERIALI E METODI

3.1. Selezione delle aziende

Le aziende arruolate nel presente studio dovevano rispondere a precisi criteri di selezione:

- presenza di almeno 14 soggetti di età superiore ai 4 mesi, sia maschi che femmine, positivi per Strongili gastrointestinali;
- tutti i soggetti dovevano frequentare lo stesso pascolo;
- ogni animale doveva essere identificabile tramite marca auricolare;
- esclusione di soggetti debilitati;
- nessun soggetto doveva essere stato trattato con lattoni macrociclici nei 60 giorni precedenti l'inizio della prova in vivo.

Per ciascuna azienda è stata ovviamente indispensabile la volontà, da parte dell'allevatore, di collaborare.

Viste le limitazioni imposte dalla legislazione vigente circa l'impiego di moxidectina ed ivermectina in bovini da latte, è stato indispensabile individuare allevamenti di animali da carne.

L'allevamento del bovino da carne in Italia, si basa molto spesso sull'importazione di ristalli dall'Est Europa o dalla Francia; tali soggetti albergano ovviamente elminti provenienti dalle popolazioni parassitarie della loro zona d'origine pertanto effettuare lo studio su questi animali avrebbe significato indagare, in verità, la realtà parassitologica degli Stati da cui essi provenivano. E' stato dunque fondamentale arruolare allevamenti che praticassero la linea vacca-vitello e sono state così selezionate in totale 5 aziende della regione Veneto, di cui tre in provincia di Belluno (Az.1, Az.2, Az.3) e due in provincia di Vicenza (Az.4, Az.5).

3.2. Selezione dei soggetti

In ciascun allevamento gli animali sono stati sottoposti ad analisi copromicroscopiche al fine di individuare i soggetti infestati.

Sono stati quindi raccolti campioni di feci individuali, prelevati direttamente dal retto, sui quali è stato poi eseguito un esame copromicroscopico quantitativo.

In ogni azienda sono stati selezionati da un minimo di 14 ad un massimo di 20 soggetti che presentavano un'escrezione fecale di uova di SGI pari o superiore a 25 u.p.g. (uova per grammo di feci).

Nel caso in cui il numero dei soggetti che rispondevano a tali requisiti fosse maggiore di venti, si procedeva scegliendo gli animali con i valori di u.p.g. più elevati.

In ciascun allevamento, i soggetti selezionati sono stati suddivisi in maniera del tutto casuale in due gruppi destinati ai due diversi trattamenti antelmintici, ciascuno costituito da un minimo di 7 ad un massimo di 10 animali.

3.3. FECRT (*Fecal Egg Count Reduction Test*)

Questi test, eseguiti nelle cinque aziende selezionate da ottobre a dicembre 2012, seguendo le linee guida fornite dalla W.A.A.V.P., consistono nella valutazione della riduzione percentuale dell'escrezione fecale di uova a seguito del trattamento antelmintico.

Gli animali vengono sottoposti ad un prelievo di feci pre-trattamento per stabilire il valore di u.p.g. di partenza. In questo studio i dati ottenuti dall'esame copromicroscopico quantitativo eseguito per la selezione dei soggetti sono stati considerati come valori di escrezione pre-trattamento. Secondo protocollo, tra questi campionamenti ed il trattamento farmacologico (Giorno 0) non dovevano intercorrere più di 7 giorni (Giorno -7).

Il secondo prelievo di feci viene eseguito a distanza di 14 giorni (± 3) dal trattamento antelmintico, momento definito Giorno +14, e a partire da questi campioni viene stabilito per ciascun animale il valore di escrezione fecale post-trattamento.

A questo punto si può dunque procedere al calcolo della riduzione percentuale dell'escrezione fecale di uova, determinata utilizzando la seguente formula (Kochapakdee *et al.*, 1995):

$$\text{FECR}\% = 100 \times \left[1 - \left(\frac{\text{u.p.g. PostTrattamento}}{\text{u.p.g. PreTrattamento}} \right) \right]$$

Dove:

- u.p.g. PreTrattamento: media aritmetica dei valori u.p.g. individuali riscontrati al giorno G-7 (primo campionamento) in ciascuno dei due gruppi trattati (MOX e IVM);

- u.p.g. PostTrattamento: media aritmetica dei valori u.p.g. individuali riscontrati al giorno G+14 (secondo campionamento) in ciascuno dei due gruppi trattati (MOX e IVM)

Per ogni valore di FECR% è stato calcolato l'intervallo di confidenza (IC) del 95% seguendo le formule matematiche proposte da Coles *et al.* (1992). In accordo con quanto stabilito da Coles *et al.* (1992) e da El-Abdellati *et al.* (2010), valori di FECR<95% e di IC (limite superiore) <90% sono stati considerati indicativi di farmacoresistenza, mentre uno solo dei due risultati al di sotto del valore di riferimento è stato considerato come indice di resistenza sospetta.

Infine, nel presente studio, per ogni azienda arruolata e per ciascun gruppo di trattamento è stata calcolata la composizione in termini percentuali dei diversi generi di SGI isolati ed identificati a partire dai pool di coprocultura allestiti sia nella fase di pre-trattamento(G-7) che, nel caso di campioni ancora positivi, in quella di post-trattamento(G+14).

Nelle tabelle 3, 4, 5, 6 e 7 sono riepilogate le diverse fasi sperimentali per ogni azienda.

Tabella 3. Azienda 1. Riepilogo delle diverse fasi sperimentali.

<i>Giorno</i>	<i>Fase sperimentale</i>
04.10.2012(G-7)	Campionamenti individuali pre-trattamento
11.10.2012(G0)	Trattamento
25.10.2012(G+14)	Campionamenti individuali post-trattamento

Tabella 4. Azienda 2. Riepilogo delle diverse fasi sperimentali.

<i>Giorno</i>	<i>Fase sperimentale</i>
25.10.2012(G-7)	Campionamenti individuali pre-trattamento
29.10.2012(G0)	Trattamento
09.11.2012(G+14)	Campionamenti individuali post-trattamento

Tabella 5. Azienda 3. Riepilogo delle diverse fasi sperimentali.

<i>Giorno</i>	<i>Fase sperimentale</i>
11.10.2012(G-7)	Campionamenti individuali pre-trattamento
25.10.2012(G0)	Trattamento
09.11.2012(G+14)	Campionamenti individuali post-trattamento

Tabella 6. Azienda 4. Riepilogo delle diverse fasi sperimentali.

<i>Giorno</i>	<i>Fase sperimentale</i>
13.11.2012(G-7)	Campionamenti individuali pre-trattamento
20.11.2012(G0)	Trattamento
04.12.2012(G+14)	Campionamenti individuali post-trattamento

Tabella 7. Azienda 5. Riepilogo delle diverse fasi sperimentali.

<i>Giorno</i>	<i>Fase sperimentale</i>
13.11.2012(G-7)	Campionamenti individuali pre-trattamento
20.11.2012(G0)	Trattamento
04.12.2012(G+14)	Campionamenti individuali post-trattamento

3.4. Protocollo terapeutico

Il giorno del trattamento (definito Giorno 0), i due diversi gruppi sperimentali selezionati in ciascuna azienda sono stati trattati rispettivamente con una delle due seguenti molecole:

- moxidectina: MOX
- ivermectina: IVM

In tabella 8 sono riportati i dosaggi ed i tempi di sospensione relativi ai due diversi farmaci utilizzati nella prova di FECR, regolarmente registrati per la specie bovina.

Tabella 8: dosaggio e tempi di sospensione dei farmaci impiegati nella prova.

<i>Principio attivo</i>	<i>Nome commerciale</i>	<i>Tempi di sospensione</i>		<i>Dosaggio</i>
		<i>Carne Latte</i>		
Moxidectina	<i>Cydectin</i> ® 1%, Pfizer	65 gg	60 gg	0,2 mg/kg PV (1 ml/50 kg PV)
Ivermectina	<i>Ivomec</i> ®, Merial	49 gg	N.P.	0,2 mg/kg PV (1 ml/50 kg PV)

La dose di farmaco da somministrare a ciascun animale è stata calcolata in base della stima del peso vivo (PV) effettuata il giorno del trattamento (G0), misurando la circonferenza toracica del soggetto mediante l'utilizzo di un apposito nastro misuratore. Entrambi i farmaci sono stati somministrati per via sottocutanea.

3.5. Analisi di laboratorio

3.5.1. Esami copromicroscopici quantitativi

Ogni campione di feci è stato sottoposto all'esame copromicroscopico quantitativo mediante tecnica di McMaster.

Da ogni campione sono stati prelevati 4 g di feci, poi diluiti e portati ad un volume di 30 ml con una soluzione 1.300 (soluzione a media densità ottenuta miscelando 100 ml di acqua distillata con 540 g di nitrato di sodio e 360 g di zucchero).

Il vetrino è stato quindi allestito come precedentemente descritto e letto al microscopio ottico a basso ingrandimento (10X) per un sensibilità della metodica pari a 25 u.p.g.

Infatti, nel caso in cui gli animali presentino bassi valori di escrezione (situazione molto frequente nei bovini), l'utilizzo della tecnica di McMaster con sensibilità pari a 50 u.p.g. risulta poco affidabile, perché incapace di rilevarli (El-Abdellati *et al.*, 2010), ed inattendibile per valutare l'efficacia di molecole antielmintiche.

3.5.2. Coproculture

Per ogni azienda sono state inoltre eseguite delle coproculture su pool di feci, ottenuti miscelando aliquote di 5 g prelevate da ciascun campione individuale del gruppo, incubati a 24°C per 14 giorni.

Tali coprocolture sono state svolte sia sui campioni pre-trattamento che su quelli post-trattamento che risultavano ancora positivi per uova di SGI all'esame copromicroscopico quantitativo; lo scopo era infatti quello di ottenere larve di terzo stadio che consentissero di identificare dapprima i generi circolanti in allevamento e successivamente quelli eventualmente resistenti al trattamento.

3.5.3. Isolamento delle larve L3: la tecnica di Baermann

Al termine del periodo d'incubazione necessario alla coprocoltura, le larve eventualmente presenti sono state isolate mediante tecnica di Baermann.

Questa consente l'isolamento delle L₃ sfruttandone l'idrotropismo ed il fototropismo positivo; il materiale proveniente dalla coprocoltura viene infatti adagiato su una garza e posizionato all'estremità superiore di un imbuto a contatto con l'acqua di cui il cono è stato precedentemente riempito. Si lascia quindi riposare per 24 ore, al termine delle quali il materiale depositatosi viene raccolto aprendo la valvola presente all'estremità inferiore dell'imbuto e facendo fluire la soluzione in una provetta (Fig. 14).



Figura 14: apparato di Baermann.

3.5.4. Identificazione dei generi parassitari

Il sedimento ottenuto dal precedente passaggio è stato quindi osservato allo stereomicroscopio, procedendo al prelievo di ciascuna larva mediante l'utilizzo di una pipetta Pasteur e al suo successivo posizionamento su un vetrino portaoggetto. Dopo aver aggiunto una goccia di liquido di Lugol, si poggiava il coprioggetto e si procedeva all'identificazione di ciascuna larva previa osservazione al microscopio ottico a 10 e 40X.

E' infatti possibile risalire al genere di appartenenza degli stadi larvali L₃ attraverso l'osservazione di determinate caratteristiche morfologiche (Fig. 15 e Fig.16), utilizzate per l'identificazione dalle chiavi proposte da Taylor *et al.* (2010):

- lunghezza totale della larva;
- lunghezza e morfologia della guaina della coda;
- numero di cellule intestinali;
- morfologia della porzione cefalica.

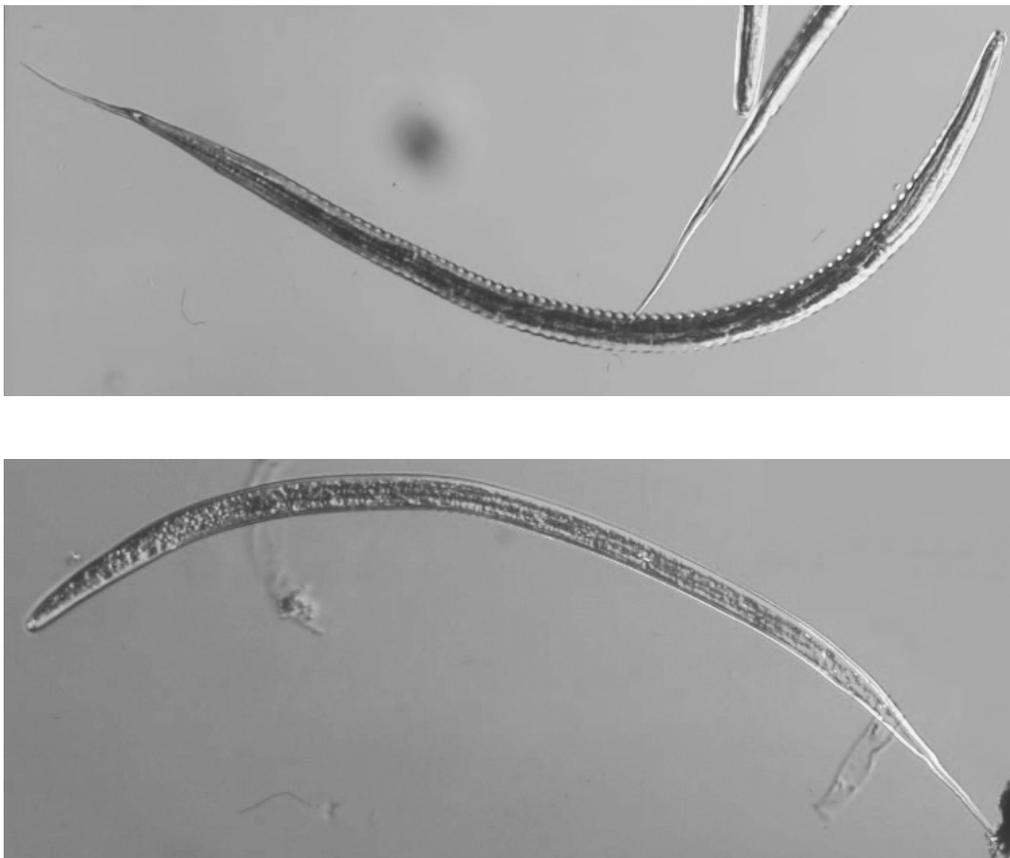


Figura 15: aspetto di una larva L₃ di *Cooperia spp.*(sopra) e *Haemonchus spp.*(sotto) al microscopio ottico (<https://www.rvc.ac.uk/Review/Parasitology/RuminantL3/Haemonchus.htm>).

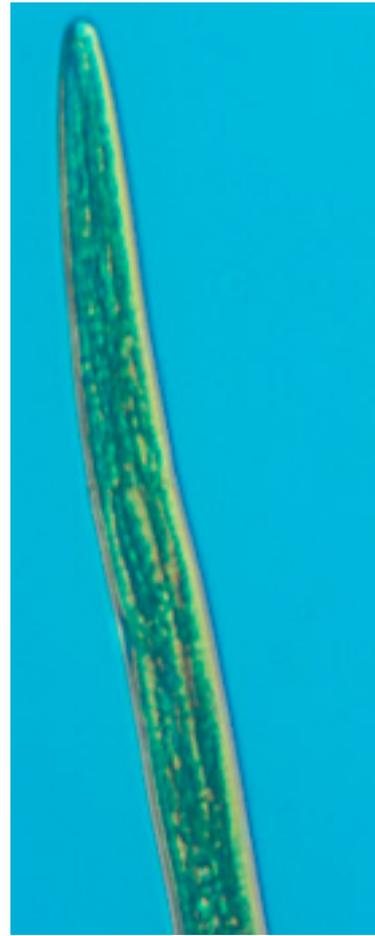
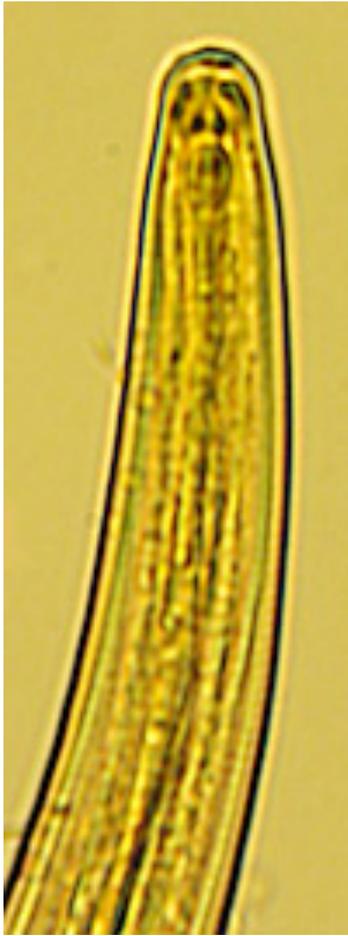
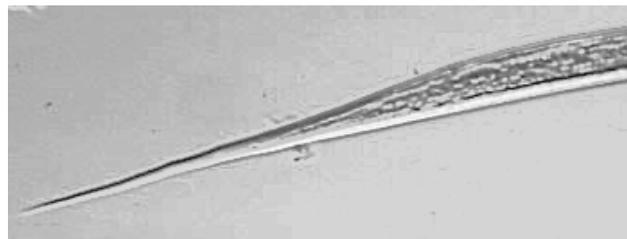


Figura 16: sopra, estremità cefalica di *Cooperia oncophora* (a sinistra) e di *Haemonchus* spp. (a destra). Sotto, differente morfologia della guaina della coda in esemplari del genere *Haemonchus* (sopra) e *Trichostrongylus* (sotto)



4. RISULTATI

4.1. Campionamenti e trattamento

Nel corso dell'intero periodo di studio sono state eseguite, in totale, 232 analisi copromicroscopiche quantitative, di cui 153 nella fase di pre-trattamento, corrispondenti al numero di soggetti campionati al fine di individuare e selezionare gli animali positivi, e 79 in quella di post-trattamento, coincidenti col numero di bovini positivi per SGI arruolati per i FECRTs.

Nella tabella 9 è riportato, per ciascuna delle cinque aziende, il numero di campioni fecali individuali esaminati nelle fasi di pre e post-trattamento.

Inoltre sono stati complessivamente allestiti 14 pool di coproculture, 10 da campioni prelevati nella fase di pre-trattamento (un pool per ogni gruppo di trattamento in ciascuna azienda) e 4 da feci prelevate nel post-trattamento dai soggetti risultati ancora positivi.

Tabella 9. Analisi copromicroscopiche effettuate in ogni azienda nelle fasi di pre e post-trattamento.

<i>Azienda</i>	<i>Pre-trattamento (G-7)</i>	<i>Post-trattamento (G+14)*</i>	<i>Totale</i>
Az.1	41	19	60
Az.2	18	18	36
Az.3	22	14	36
Az.4	28	14	42
Az.5	44	14	58
Totale	153	79	232

*= numero di animali arruolati per i FECRTs

4.2. FECRTs

Nella tabella 10 vengono riportati, per ciascuna azienda, i valori medi di peso vivo (PV) riscontrati nei diversi gruppi sperimentali (MOX e IVM) al momento del trattamento.

Tabella 10. Valori medi di peso vivo per gruppo di trattamento (MOX= moxidectina, IVM= ivermectina).

<i>Azienda</i>	<i>Gruppo di trattamento (n. di animali)</i>	<i>Peso vivo (kg)</i>	<i>ds</i>
Az.1	IVM (9)	357,2	145,8
	MOX (10)	387,5	156,2
Az.2	IVM (9)	263,3	33,5
	MOX (9)	271,1	36,6
Az.3	IVM (8)	512,5	91,6
	MOX (6)	498,3	81,6
Az.4	IVM (8)	678,8	36,4
	MOX (6)	721,7	31,9
Az.5	IVM (6)	708,3	106,8
	MOX (8)	731,3	65,1

ds=deviazione standard

Nella tabella 11 vengono riassunti i risultati delle prove di FECRTs effettuate in ciascuna delle cinque aziende oggetto di studio.

Tabella 11. Risultati delle prove di FECR condotte in ciascuna azienda.

<i>Azienda</i>	<i>Gruppo trattamento</i>	<i>Valori medi, min-max di u.p.g. (n. animali positivi)</i>				<i>FECR (%)</i>	<i>IC* (%)</i>	<i>R**</i>
		<i>pre-trattamento</i>		<i>post-trattamento</i>				
Az.1	IVM	97,2	50-400 (9)	19,4	0-100 (3)	80,0	95,4	Sospetta
	MOX	62,5	50-125 (10)	0,0	-	100,0	-	Assente
Az.2	IVM	130,6	25-450 (9)	5,6	0-25 (2)	95,7	99,1	Assente
	MOX	111,1	25-400 (9)	0,0	-	100,0	-	Assente
Az.3	IVM	40,6	25-100 (8)	6,3	0-50 (1)	84,6	98,1	Sospetta
	MOX	41,7	25-75 (6)	0,0	-	100,0	-	Assente
Az.4	IVM	50,0	25-200 (8)	0,0	-	100,0	-	Assente
	MOX	41,7	25-75 (6)	0,0	-	100,0	-	Assente
Az.5	IVM	41,7	25-100 (6)	0,0	-	100,0	-	Assente
	MOX	59,4	25-225 (8)	3,1	0-25 (1)	94,7	99,4	Sospetta

* Limite superiore (FECR %) dell'intervallo di confidenza (IC)

**R=resistenza alla molecola

In una sola azienda (Az.4) è stata evidenziata la totale efficacia (FECR=100%) di entrambe le molecole antielmintiche utilizzate nella prova di FECRT.

Per quanto riguarda l'ivermectina, è stata riscontrata una situazione di sospetta resistenza nelle aziende 1 (FECR=80%; IC=95,4) e 3 (FECR=84,6%; IC=98,1%), mentre nelle aziende 2 e 5 tale principio attivo è risultato efficace con valori di FECR rispettivamente del 95,7% (appena superiore al limite soglia) e del 100%.

La moxidectina è risultata totalmente efficace (FECR=100%) in quattro delle cinque aziende arruolate per la prova. L'unica eccezione è, infatti, rappresentata dall'azienda 5, dove la percentuale di riduzione dell'escrezione fecale di uova indotta dalla molecola è apparsa di poco inferiore al valore soglia (94,7%; IC=99,4%).

4.3. Identificazione dei generi di SGI

Sono state complessivamente identificate 63 larve di terzo stadio (L₃), di cui:

- 51 esemplari (pari all'81%) appartenenti al genere *Haemonchus*;
- 9 esemplari (pari al 14,3%) appartenenti al genere *Cooperia*;
- 2 esemplari (pari al 3,2%) appartenenti al genere *Chabertia/Oesophagostomum*;
- 1 esemplare (pari all'1,6%) appartenente al genere *Ostertagia*.

Sia per quanto riguarda l'ivermectina (IVM) che la moxidectina (MOX), le identificazioni condotte sulle coprocolture allestite a partire dai campioni risultati positivi nel post-trattamento hanno messo in evidenza L₃ appartenenti al solo genere *Haemonchus*.

5. CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

Lo scopo del presente studio è stato quello d'indagare, in alcuni allevamenti bovini della regione Veneto, sulla possibile presenza di ceppi di strongili gastrointestinali (SGI) resistenti nei confronti di due composti appartenenti alla categoria dei lattoni macrociclici. Le due molecole prese in esame sono l'ivermectina, per lungo tempo principale farmaco utilizzato nel trattamento delle elmintiasi degli animali da reddito, e la moxidectina.

Allo scopo sono state condotte delle prove in vivo rappresentate da Faecal Egg Count Reduction Tests (FECRTs) in accordo con le indicazioni fornite dalla W.A.A.V.P. (World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology).

Per poter comparare i dati delle analisi copromicroscopiche quantitative ottenuti nelle fasi di pre e post-trattamento nelle cinque diverse aziende è stato necessario utilizzare una soglia di sensibilità ≥ 25 u.p.g..

I bassi livelli d'infestazione tipici dei bovini adulti impongono, infatti, l'utilizzo di una metodica dotata di buona sensibilità, poiché la risposta immunitaria dell'organismo ospite è in grado di contenere il numero di parassiti adulti albergati nel tratto gastroenterico. Questo aspetto, associato anche all'effetto di "diluizione" dovuto alla elevata quantità di feci prodotta da questi animali, si traduce inevitabilmente in una ridotta escrezione di uova nelle feci, tanto che nell'esperienza condotta è stato possibile arruolare solo 79 dei 153 individui testati (pari al 51,6%), perché unici a soddisfare il prerequisito iniziale.

I test sono stati dunque eseguiti, in ogni azienda, su un numero minimo di quattordici soggetti positivi all'infestazione, nel periodo tra ottobre e dicembre 2012.

Le prove di FECR eseguite sugli animali hanno messo in evidenza una differente efficacia dei due antelmintici testati; in particolare, l'ivermectina è risultata solo parzialmente efficace in due aziende su cinque, con dei valori di FECR < 95%, mentre l'efficacia della moxidectina è risultata appena inferiore al limite soglia in una sola azienda, con una percentuale di FECR pari al 94,7%.

Le coproculture allestite a partire dai campioni positivi nel post-trattamento hanno fornito in realtà un numero esiguo di larve, giustificato dall'inibizione dello sviluppo larvale provocata dalla frazione di farmaco eliminata in forma tal quale con le feci (Tyrrell *et al.*, 2002).

Ad ogni modo, le identificazioni eseguite su questi pool fecali hanno evidenziato una netta prevalenza del genere *Haemonchus* (cui apparteneva ben l'81% delle larve identificate) ed è proprio nei confronti di questo genere che ivermectina e moxidectina hanno manifestato una ridotta efficacia in tre delle cinque aziende testate.

Dal dialogo con gli allevatori, è emerso che, anche in queste realtà, i lattoni macrociclici rappresentano, ormai da tempo, la categoria di antelmintici più frequentemente impiegata nel trattamento di queste parassitosi.

Tale classe di farmaci detiene, infatti, da molti anni la maggior quota di mercato tra gli antiparassitari nell'allevamento bovino, non solo per l'elevata maneggevolezza e l'efficacia di queste molecole nei confronti di tutti gli stadi di sviluppo degli elminti, ma anche per la persistenza dell'effetto farmacologico e la loro attività nei confronti degli ectoparassiti.

In particolare solo nelle aziende 1 e 2 si effettuano due trattamenti l'anno, uno in primavera prima del pascolo, l'altro in autunno, alternando l'utilizzo di due diverse categorie di antelmintici (benzimidazolici e lattoni macrociclici). Nell'azienda 1 tale pratica è entrata in uso negli ultimi cinque anni, con l'aggiunta dei benzimidazolici che hanno sostituito i lattoni macrociclici nel trattamento autunnale, dal quale vengono tuttavia esclusi (in modo un po' empirico) i soggetti che "visivamente" presentano uno sviluppo ed un BCS accettabile secondo l'allevatore.

Nelle altre tre aziende (Az.3, Az.4 e Az.5) è invece previsto un solo trattamento l'anno, effettuato al ritorno dal pascolo in autunno, utilizzando in maniera piuttosto costante ivermectina ed eprinomectina.

È interessante notare che solo nell'azienda 2 la prevalenza delle SGI nella fase pre-trattamento risultava pari al 100 %; non a caso questo rappresentava l'unico allevamento in cui il campione di soggetti testati era interamente costituito da vitelli giovani nati in primavera (peso medio 263-271 kg, tab. 10).

In tutti gli altri allevamenti e in particolare, nelle aziende 4 e 5 (dove tutti i bovini erano adulti con un peso medio di 700 kg) i gruppi erano composti in numero più o meno variabile anche da soggetti adulti (vacche nutrici o manzi già al secondo anno di pascolo) che, pur con un'escrezione fecale superiore alle 25 u.p.g., manifestavano prevalenze medio basse.

Ciò conferma che sono i soggetti giovani, al primo anno di pascolo e pertanto recentemente esposti all'infestazione, a presentare le prevalenze maggiori per strongilosi gastrointestinali.

Per ciò che concerne invece la gestione del pascolo, l'unica a praticare una regolare rotazione era l'azienda 2: questa disponeva infatti di una superficie di circa 50 ettari, suddivisi in dieci parcelle, sulla quale venivano caricati complessivamente 115-120 capi equamente ripartiti tra vitelli e vacche nutrici.

L'azienda 3, che ormai da diversi anni impiegava esclusivamente i lattoni macrociclici con un unico trattamento in autunno, sfruttava un unico recinto all'interno del quale venivano caricati circa quaranta capi tra vacche nutrici e rispettivi vitelli.

I risultati di questo studio confermano dunque il sospetto che anche nella realtà veneta, come in molte altre aree del mondo, stiano emergendo popolazioni di SGI resistenti ai lattoni macrociclici. L'antelmintico-resistenza nei confronti di tali principi attivi è il risultato del loro impiego indiscriminato nel corso degli anni e della pressione selettiva che i continui trattamenti hanno esercitato sulle popolazioni parassitarie.

È importante sottolineare che, come già affermato da Wolstenholme *et al.* (2004), la chemioresistenza non rappresenta l'inevitabile conseguenza dell'impiego di una molecola: sebbene i trattamenti favoriscano indubbiamente la selezione dei soggetti portatori di alleli "resistenti", un utilizzo oculato ed una corretta gestione del farmaco possono ritardare notevolmente l'insorgenza del fenomeno.

Alla luce di quanto detto, è possibile individuare alcune strategie che consentono di ridurre la pressione selettiva sulle popolazioni parassitarie: essenziale sarebbe ridurre il carico di animali per unità di superficie e praticare con regolarità la rotazione dei pascoli, in modo da garantire una bassa contaminazione ambientale ed un'esposizione graduale ai parassiti, soprattutto nei soggetti giovani.

Altrettanto importante sarebbe alternare l'impiego di farmaci con un diverso meccanismo d'azione, soprattutto in quelle realtà in cui la gestione aziendale espone gli animali ad un maggiore rischio d'infestazione; dove invece la contaminazione ambientale è bassa e consente sia il contatto graduale con gli elminti che l'instaurarsi di un'immunità efficace, è preferibile ridurre al minimo gli interventi di sverminazione, collocandoli nei momenti strategici.

Andrebbe inoltre considerata la possibilità di intervenire solo sui soggetti maggiori eliminatori, stabilendo quindi delle soglie per la selezione degli individui da trattare (Vercruysse *et al.*, 2001).

Gli animali non dovrebbero poi accedere al pascolo nelle 24-36 ore successive al trattamento; ciò potrebbe infatti comportare la contaminazione del terreno non solo con uova fertili, nel caso in cui si impieghino farmaci privi di attività ovicida, ma anche con uova di eventuali ceppi resistenti refrattari al trattamento (Ambrosi *et al.*, 1995).

Attualmente sono disponibili sul mercato, per questa classe di antelmintici, formulazioni pour-on e iniettabili molto apprezzate dagli allevatori per la loro praticità d'uso; bisogna infatti ammettere che la maggior efficacia osservata per le preparazioni ad uso orale (dovuta a maggiori concentrazioni di principio attivo che raggiungono il parassita) (Leathwick *et al.*, 2013) si scontra, in primo luogo, con la minore praticità di queste formulazioni, e successivamente con la mancanza, in Italia, di simili prodotti registrati per la specie bovina.

Quale che sia la tipologia scelta per il trattamento, rimane essenziale l'attenta somministrazione del farmaco poichè altro considerevole fattore di rischio è proprio il sottodosaggio, che spesso deriva da un'errata posologia.

Per contrastare in maniera efficace l'insorgere della chemioresistenza resta, ovviamente, fondamentale adottare un sistema di monitoraggio capace di individuare precocemente la comparsa del fenomeno all'interno delle popolazioni parassitarie. Per fare ciò, è indispensabile disporre di strumenti diagnostici validi, tecniche facilmente applicabili alla realtà di campo che forniscano però al contempo informazioni attendibili circa lo stato dell'azienda.

I dati più affidabili proverrebbero in verità dalla verifica in sede di necropsia, assolutamente improponibile nella realtà di campo; pertanto, sebbene non sia possibile dimostrare che i valori di u.p.g. ottenuti con i test coprologici siano sempre equiparabili ai risultati ottenuti in sede anatomopatologica, soprattutto in quelle situazioni in cui il fenomeno non ha ancora raggiunto proporzioni elevate (Zanetti Lopes *et al.*, 2013), i FECRTs rimangono un'importante strumento per lo studio della resistenza ai lattoni macrocicli, pur necessitando di qualche revisione (Calvete *et al.*, 2013).

Soprattutto per ciò che riguarda la moxidectina, i risultati della prova andrebbero, infatti, riesaminati alla luce di quanto emerso da recenti studi: questi hanno infatti

evidenziato una riduzione della fecondità (quindi della quantità di uova deposte) nelle femmine di SGI sopravvissute al trattamento con tale molecola, effetto che invece non è stato osservato nei parassiti raccolti dagli animali trattati con ivermectina. Ciò suggerisce che gli studi riguardanti tale principio attivo potrebbero richiedere, per una valutazione attendibile, un intervallo trattamento-campionamento superiore ai 14-17 giorni proposti dalle stesse linee guida della W.A.A.V.P. (De Graef *et al.*, 2012).

Un aspetto assolutamente da non sottovalutare nella conduzione delle prove in vivo è rappresentato dalla sensibilità espressa dalle diverse tecniche copromicroscopiche utilizzate per la determinazione dei valori u.p.g. pre e post-trattamento. Infatti, studi condotti recentemente (Levecke *et al.*, 2012) hanno messo in evidenza come la precisione dei FECRTs possa essere influenzata dalla metodica impiegata per la determinazione delle conte fecali. Pertanto, anche in questo senso e soprattutto per specie come quella bovina, nella quale si evidenziano generalmente bassi valori u.p.g., si renderebbe necessaria una standardizzazione delle metodiche copromicroscopiche.

Infine, vista la dinamicità del fenomeno della chemioresistenza, nuove risorse andranno sicuramente investite per approfondirne la conoscenza e comprendere in maniera dettagliata sia i meccanismi che lo innescano che quelli attraverso i quali esso si manifesta.

6. BIBLIOGRAFIA

Almería S., Adelantado C., Charlier J., Claerebout E., Bach A. (2009) - Ostertagia ostertagi antibodies in milk samples: Relationships with herd management and milk production parameters in two Mediterranean production systems of Spain. - Veterinary science, vol. 87, pag. 416-420

Alvarez-Sanchez M.A.A., Perez-Garcia J., Cruz-Rojo M.A., Rojo-Vazquez F.A. (2005) - Real time PCR for the diagnosis of benzimidazole resistance in trichostrongylids of sheep – Vet. Par., vol.129, pag. 291-298

Mejía M.E., Fernández Igartúa B.M., Schmidt E.E., Cabaret J. (2003) - Multispecies and multiple anthelmintic resistance on cattle nematodes in a farm in Argentina: the beginning of high resistance? - Vet. Res., vol. 34, pag. 461–467

Ambrosi M. – Parassitologia zootecnica – 1995, Edagricole

Anziani O.S., Suarez V., Guglielmone A.A., Warnke O., Grande H., Coles G.C. (2004) - Resistance to benzimidazole and macrocyclic lactone anthelmintics in cattle nematodes in Argentina - Veterinary Parasitology, vol. 122, pag. 303–306

Areskog M., Engström A., Tallkvist J., Von Samson-Himmelstjerna G., Höglund J. (2013) - PGP expression in *Cooperia oncophora* before and after ivermectin selection – Parasitol. Res. , vol.112, pag. 3005–3012

Areskog M., Sollenberg S., Engström A., von Samson-Himmelstjerna G., Höglund J. (2013) - A controlled study on gastrointestinal nematodes from two Swedish cattle farms showing field evidence of ivermectin resistance – Parasites and Vectors 7:13

Battelli G., Restani R. (1982) Importanza economica e controllo delle principali elmintiasi dei bovini – Società italiana di buiatria, vol.14, pag. 99-110

Beech R.N., Skuce P., Bartley D.J., Martin R.J., Prichard R.K., Gilleard J.S. (2011) - Anthelmintic resistance: markers for resistance, or susceptibility? – Parasitology, vol. 138, pag.160-174

Blackhall W.J., Pouliot J., Prichard R.K., and Beech R.N. (1998) - *Haemonchus contortus*: selection at a glutamate-gated chloride channel gene in ivermectin- and moxidectin-selected strains - Experimental Parasitology, vol. 90, pag. 42–48

Calvete C., Uriarte J. (2013) - Improving the detection of anthelmintic resistance: evaluation of faecal egg count reduction test procedures suitable for farm routines -

Veterinary Parasitology, vol. 196, pag. 438–452

Capelli G., Poglayen G., Sorgi C., De Guelmi A., Gatti F. (1993) – Indagine coprologica e dinamica larvale di strongili gastrointestinali in bovini all'alpeggio: risultati preliminari – Soc.tà italiana di buiatria, vol XXV, pag. 355-364

Charlier J., Claerebout E., De Muelenaere E., Vercruysse J. (2005) – Associations between dairy herd management factors and bulk tank milk antibody levels against *Ostertagia ostertagi*. - Veterinary Parasitology, vol. 133, pag. 91-100

Charlier J., Hoglund J., Von Samson-Himmelstjerna G., Dorny P., Vercruysse J. (2009) - Gastrointestinal nematode infections in adult dairy cattle: Impact on production, diagnosis and control - Vet. Par., vol.164, pag. 70-79

Charlier J., Vercruysse J., Smith J., Vanderstichel R., Stryhn H., Claerebout E., Dohoo I. (2010) – Evaluation of anti-*Ostertagia ostertagi* antibodies in individual milk samples as decision parameter for selective anthelmintic treatment in dairy cows. - Prev. Vet. Med., vol.93, pag. 147-152

Coles G.C., Bauer C., Borgsteede F.H.M., Geerts S., Klei T.R., Taylor M.A., Waller P.J. (1992) - World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance – Vet. Par., vol.44, pag.35-44

Coles G.C., Jackson F., Pomroy W.E., Prichard R.K., Von Samson-Himmelstjerna G., Silvestre A., Taylor M.A., Vercruysse J. (2006) – The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance – Vet. Par., vol. 136, pag. 167-185

Condi G.K., Soutello R.G.V., Amarante A.F.T. (2009) - Moxidectin-resistant nematodes in cattle in Brazil - Vet. Par., vol. 161, pag. 213–217

Corwin R.M. (1997) - Economics of gastrointestinal parasitism of cattle - Veterinary Parasitology, vol. 72, pag. 451-460

Cringoli G. (2011) – Parassiti d'Italia – Imago editrice

Cringoli G., Rinaldi L. (2003) - Water as risk factor for helminthiasis in domestic ruminants in the central and southern Italy and zoonotic risk – Annali d'igiene: Medicina preventiva e di comunità, vol. 15, pag.43-46

De Graef J., Sarre C., Mills B.J., Mahabir S., Casaert S., De Wilde N., Van Weyenberg M., Geldhof P., Marchiondo A., Vercruysse J., Meeus P., Claerebout E. (2012) - Assessing resistance against macrocyclic lactones in gastrointestinal nematodes in cattle

using the faecal egg count reduction test and the controlled efficacy test – Vet. Par., vol.189, pag. 378-382

Demeler J., Krücken J., AlGusbi S., Ramünke S., De Graef J., Kerboeuf D., Geldhof P., E. Pomroy W.E., Von Samson-Himmelstjerna G. (2013) - Potential contribution of P-glycoproteins to macrocyclic lactone resistance in the cattle parasitic nematode *Cooperia oncophora* – Molecular and Biochemical Parasitology, vol. 188, pag. 10-19

Demeler J., Van Zeveren A.M.J., Kleinschmidt N., Vercruysse J., Høglund J., Koopman R., Cabaret J., Claerebout E., Areskog M., Von Samson-Himmelstjerna G. (2009) – monitoring the efficacy of ivermectin and albendazole against gastrointestinal nematodes of cattle in Northern Europe – Vet. Par., vol 160, pag.109-115

El-Abdellati A., Charlier J., Geldhof P., Levecke B., Demeler J., von Samson-Himmelstjerna G., Claerebout E., Vercruysse J. (2010) - The use of a simplified faecal egg count reduction test for assessing anthelmintic efficacy on Belgian and German cattle farms - Veterinary Parasitology, vol.169, pag. 352–357

Elard L., Cabaret J., Humbert J.F. (1999) - PCR diagnosis of benzimidazole-susceptibility or -resistance in natural populations of the small ruminant parasite, *Teladorsagia circumcincta* – Vet. Par., vol.80, pag. 231-237

Eysker M., Van Meurs G.K. (1982) - Seasonal pattern in the strongyle egg output of adult dairy cows in the Netherlands – Res. Vet. Sci, vol.33, pag. 208-211

Fiel C.A., Saumell C.A., Steffan P.E., Rodriguez E.M. (2001) - Resistance of *Cooperia* to ivermectin treatments in grazing cattle of the Humid Pampa, Argentina – Vet. Par., vol. 97, pag. 211-217

Forbes A.B., Vercruysse J., Charlier J. (2008) - A survey of the exposure to *Ostertagia ostertagi* in dairy cow herds in Europe through the measurement of antibodies in milk samples from the bulk tank. - Vet. Par., vol.157 ,pag. 100-107

Fox M.T. (1993) - Pathophysiology of infection with *Ostertagia ostertagi* in cattle - Vet Parasitol., vol. 46, pag.143-58

Gasbarre L.C. (2014) - Anthelmintic resistance in cattle nematodes in the US - Veterinary Parasitology

Gasbarre Louis C., Smith Larry L., Lichtenfels J. Ralph, Pilitt Patricia A. (2009) - The identification of cattle nematode parasites resistant to multiple classes of anthelmintics in a commercial cattle population in the US – Vet. Par., vol. 166, pag. 281-286

Gasbarre Louis C., Smith Larry L., Lichtenfels J. Ralph, Pilitt Patricia A. (2009) - Further characterization of a cattle nematode population with demonstrated resistance to current anthelmintics – Vet. Par., vol. 166, pag. 275-280

Genchi C., Amorena M., Cringoli G., Musella V., Santaniello A., Veneziano V. (2008) – Mappe parassitologiche – Rolando editore

Girardi C. (1982) – Efficacia e limiti degli antielmintici - Soc.tà italiana di buiatria, vol.14, pag. 85-97

Gronvold J., Wolstrup J., Larsen M., Henriksen S.A., Nansen P. (1993) - Biological control of *Ostertagia ostertagi* by feeding selected nematode-trapping fungi to calves - Journal of helminthology, vol. 67, pag. 31-36

Gross S.J., Ryan W.G., Ploeger H.W. (1999) - Anthelmintic treatment of dairy cows and its effect on milk production – Vet. Rec., vol. 144, pag.581-587

Kaplan R.M. (2004) - Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report – Trends in parasitology, vol.20, No.10

Kaplan R.M., Vidyashankar A.N. (2012) - An inconvenient truth: Global worming and anthelmintic resistance - Veterinary Parasitology, vol. 186, pag. 70–78

Kochapakdee S., Pandey V.S., Pralomkarn W., Choldumrongkul S., Ngampongsai W., Lawpetchara A. (1995) – Anthelmintic resistance in goats in Southern Thailand – Vet. Rec., vol 137, pag.124-125

Leathwick D.M. (2013) - Managing anthelmintic resistance – Parasite fitness, drug use strategy and the potential for reversion towards susceptibility – Vet. Par., vol. 198, pag. 145-153

Leathwick D.M., Miller C.M. (2013) - Efficacy of oral, injectable and pour-on formulations of moxidectin against gastrointestinal nematodes in cattle in New Zealand - Vet. Par., vol. 161, pag. 293-300

Leignel V., Silvestre A., Humbert J.F., Cabaret J. (2010) - Alternation of anthelmintic treatments: A molecular evaluation for benzimidazole resistance in nematodes – Vet. Par., vol. 172, pag. 80-88

Lespine A., Ménez C., Bourguinat C., Prichard R.K. (2012) - P-glycoproteins and other multidrug resistance transporters in the pharmacology of anthelmintics: prospects for reversing transport-dependent anthelmintic resistance - International journal for parasitology: drugs and drug resistance, vol. 2, pag. 58–75

Levecke B., Rinaldi L., Charlier J., Maurelli M.P., Bosco A., Vercruysse J., Cringoli G. (2012) - The bias, accuracy and precision of faecal egg count reduction test results in cattle using McMaster, Cornell-Wisconsin and FLOTAC egg counting methods - Vet. Par., vol. 188, pag.194-199

Lifschitz A., Suarez V.H., Sallovitz J., Cristel S.L., Imperiale F., Ahoussou S., Schiavi C., Lanusse C. (2010) - Cattle nematodes resistant to macrocyclic lactones: Comparative effects of P-glycoprotein modulation on the efficacy and disposition kinetics of ivermectin and moxidectin – Experimental parasitology, vol. 125, pag. 172-178

Loveridge B., McArthur M., McKenna P.B., Mariadass B. (2003) - Probable multigeneric resistance to macrocyclic lactone anthelmintics in cattle in New Zealand - New Zealand Veterinary Journal, vol. 51, pag. 139-141

Mejía M.E., Perri A.F., Licoff N., Miglierina M.M., Cseh S., Ornstein A.M., Becu-Villalobos D., Lacau-Mengido I.M. (2011) - Comparison of three methods for gastrointestinal nematode diagnosis determination in grazing dairy cattle in relation to milk production – Vet. Par., vol. 183, pag.174-177

Palcy C., Silvestre A., Sauve C., Cortet J., Cabaret J. (2010) - Benzimidazole resistance in *Trichostrongylus axei* in sheep: long-term monitoring of affected sheep and genotypic evaluation of the parasite – The Vet. Journal, vol.183, pag. 68-74

Pietrobelli M., Ciani M., Nicoloso P., Silvestrelli L. (1988) - Parassitosi dell'apparato digerente del bovino: indagini preliminari in Friuli Venezia Giulia - Parassitologia 30 (Suppl.1), pag. 142-143

Poglayen G., Capelli G., Martini M., Zampiccoli R. (1995) – Epidemiologia delle parassitosi dell'apparato digerente del bovino nella provincia autonoma di Trento – Soc.tà italiana di buiatria, vol. XXVII, pag.483-489

Prichard R., Ménez C., Lespine A. (2012) - Moxidectin and the avermectins: consanguinity but not identity - International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance, vol. 2, pag.134–153

Prichard R.K., Hall C.A., Kelly J.D., Martin I.C., Donald A.D. (1980) - The problem of anthelmintic resistance in nematodes - Australian Veterinary Journal, vol. 56, pag. 239-251

Prichard R.K., Roulet A. (2007) - ABC transporters and beta-tubulin in macrocyclic lactone resistance: prospects for marker development - Parasitology, vol. 134, pag. 1123-1132

Restani R., Brancaccio M., De Laurentis F. (1972) - Moderni indirizzi di lotta alle Strongilosi gastrointestinali dei bovini – Società italiana di buiatria, vol. 4, pag. 66-128

Ruggeri M., Preti R., Martino P.A., Manfredi M.T. (2008) - Aspetti sanitari di origine parassitaria dell'allevamento biologico del bovino da latte - Large Animal Review, vol. 14, pag. 211-216

Sanchez J., Dohoo I., Carrier J., DesCoteaux L. (2004) - A meta-analysis of the milk-production response after anthelmintic treatment in naturally infected adult dairy cows – Preventive Veterinary Medicine, vol. 63, pag. 237–256

Sangster N.C. (1999) - Anthelmintic resistance: past, present and future - International Journal for Parasitology, vol. 29, pag.115-124

Silvestre A., Humbert J.F. (2002) - Diversity of benzimidazole-resistance alleles in populations of small ruminant parasites - International Journal for Parasitology, vol.32, pag. 921–928

Soutello R.G.V., Seno M.C.Z., Amarante A.F.T. (2007) - Anthelmintic resistance in cattle nematodes in northwestern Sao Paulo State, Brazil - Vet. Par., vol. 148, pag. 360-364

Stancampiano L., Corradini D., Bulgarelli M., Micagni G., Battelli G. (2007) - Parasites of the digestive tract in beef cattle imported from France to Italy - Parassitologia, vol. 49 (1-2), pag.101-106.

Suarez V.H., Cristel S.L. (2007) - Anthelmintic resistance in cattle nematode in the western Pampeana Region of Argentina – Vet. Par., vol. 144, pag. 111-117

Sutherland I.A., Leathwick D.M. (2011) - Anthelmintic resistance in nematode parasites of cattle: a global issue? - Trends in Parasitology, vol. 27, No. 4

Taylor M.A., Coop R.L., Wall R.L. - Veterinary parasitology - 2007, Blackwell Publishing editore

Tyrrell K.L., Dobson R.J., Stein P.A., Walkden-Brown S.W. (2002) - The effects of ivermectin and moxidectin on egg viability and larval development of ivermectin-resistant *Haemonchus contortus* - Vet. Par., vol 107, pag. 85-93

Urquhart GM, Armour J, Duncan JL, Dunn AM, Jennings FW (1998) – Parassitologia veterinaria - Utet editore

Vanderstichel R., Dohoo I., Sanchez J., Sithole F., Keefe G., Stryhn H. (2013) -

Predicting the effect of anthelmintic treatment on milk production of dairy cattle in Canada using an *Ostertagia ostertagi* ELISA from individual milk samples - Preventive Veterinary Medicine, vol. 111, pag. 63– 75

Vercruysse J., Claerebout E. (2001) - Treatment vs non-treatment of helminth infections in cattle: defining the threshold – Vet. Par., vol. 98, pag.195-214

Vercruysse J., Holdsworth P., Letonja T., Barth D., Conder G., Hamamoto K., Okano K. (2001) - International harmonisation of Anthelmintic Efficacy Guidelines – Vet. Par., vol. 96, pag. 171-193

Vermunt J.J., West D.M., Pomroy W.E. (1996) - Inefficacy of moxidectin and doramectin against ivermectin-resistant *Cooperia spp.* of cattle in New Zealand – New Zealand Veterinary Journal, vol. 88, pag. 188-193

Viana R.B., Bispo J.P.B., de Arauj C.V., Benigno R.N.M., Monteiro B.M., Gennari S.M. (2009) - Parasitic dynamics of gastrointestinal nematode infection in the periparturient period of beef cattle in the State of Para - Revista brasileira de parasitologia veterinaria, volume 18, pag. 49-52

Von Samson-Himmelstjerna G. (2006) - Molecular diagnosis of anthelmintic resistance – Vet. Par. 136, pag. 99-107

Waller P.J. (1997) - Anthelmintic resistance – Vet. Par., vol. 72, pag. 391- 412

William J. Blackhall W.J., Liu H.Y., Xu M., Prichard R.K., Beech R.N. (1998) - Selection at a P-glycoprotein gene in ivermectin- and moxidectin-selected strains of *H. contortus* - Molecular and Biochemical Parasitology, vol. 95, pag. 193-201

Wolstenholme A.J., Fairweather I., Prichard R., von Samson-Himmelstjerna G., Sangster N.C. - Drug resistance in veterinary helminths – Trends in parasitology, vol. 20, No. 10, pag. 469- 476

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

Xiao L., Gibbs H.C. (1992) - Effects of clinically apparent and subclinical *Ostertagia ostertagi* infections on nitrogen and water metabolism in calves - Am. J. Vet. Res., vol. 53, pag. 2009-12

Xiao L., Gibbs H.C. (1992) - Nutritional and pathophysiologic effects of clinically apparent and subclinical infections of *Ostertagia ostertagi* in calves – Am. J. Vet. Res., vol. 53, pag. 2013-8

Yazwinski T.A., Tucker C.A., Powell J., Reynolds J., Hornsby P., Johnson Z. (2009) - Fecal egg count reduction and control trial determinations of anthelmintic efficacies for several parasiticides utilizing a single set of naturally infected calves – Vet. Par., vol 164, pag. 232-241

Yazwinski T.A., Tucker C.A., Wray E., Jones L., Reynolds J., Hornsby P., Powell J. (2013) - Control trial and fecal egg count reduction test determinations of nematocidal efficacies of moxidectin and generic ivermectin in recently weaned, naturally infected calves - Veterinary Parasitology, vol. 195, pag. 95– 101

Zanetti Lopes W.D., Pires Teixeira W.F., Felippelli G., Cruz B.C., Maciel W.G., Soares V.E., Rabelo dos Santos T., Vinicius Shigaki de Matos L., Fávero F.C., Da Costa A.J. (2014) - Assessing resistance of ivermectin and moxidectin against nematodes in cattle naturally infected using three different methodologies - Research in Veterinary Science, vol. 96, pag. 133–138

Zanutto S. (2011) - Malattie parassitarie in ruminanti allevati con metodo biologico in Veneto. Tesi di Laurea di Dottorato di Ricerca in Scienze Veterinarie, indirizzo in Scienze Biomediche Veterinarie e Comparete - XXIII ciclo, Università di Padova

Zatti E., Morganti R. (1973) - Le strongilosi gastrointestinali negli allevamenti intensivi di vitelloni - Atti della Società Italiana di Buiatria, Vol. V

7. SITI INTERNET CONSULTATI

<http://archive.sciencewatch.com/dr/erf/2008/08aprperf/08aprperfKap1/>

http://dc204.4shared.com/doc/swbKcj_b/preview.html

<http://quizlet.com/22025742/veterinary-parasitology-flash-cards/>

<http://wileyvch.ebookshelf.de/products/readingepub/productid/3721390/title/Veterinary%2BParasitology.html?lang=en>

<http://www.bariparasitology.it/Root/File/Dinamiche/Volantino/737/volantino.pdf>

<http://www.buiatria.it/index.php/raccolta-atti-sib>

http://www.infocarne.com/documentos/enfermedades_parasitarias_bovinos_ovinos_cap

http://www.link.vet.ed.ac.uk/parasitology/InfectionAndImmunity/P_08Nematodes/Parasites/Haemonchus/HaemonchusAdultsAbomasum.htm

http://www.merckmanuals.com/vet/digestive_system/gastrointestinal_parasites_of_ruminants/gastrointestinal_parasites_of_cattle.html

<http://www.ordinevetverona.it/public/userfiles/Capelli-Bovini-terapia.pdf>

http://www.parassitologia.unina.it/Cremopar/mappe/bovini_appenino_meridionale.pdf

<http://www.sheepcrc.org.au/management/genetic-selection/-worm-resistance.php>

<https://www.rvc.ac.uk/Review/Parasitology/RuminantL3/Haemonchus.htm>