



uniss
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

Dipartimento di Medicina Veterinaria
Corso di Dottorato in Scienze Veterinarie
Indirizzo: Produzione Qualità e Sicurezza Alimentare
Ciclo: XXXII
Coordinatore del Corso Prof.ssa Fiammetta Berlinguer

Fasciola hepatica in Sardegna: caratterizzazione fenotipica, valutazione dell'andamento climatico, della stagionalità e diffusione della parassitosi.

Tutor:
Chiar.mo Prof. Giovanni Garippa

Dottoranda
Dott.ssa Elisabetta Pintore

Anno Accademico 2018/2019



La presente tesi è stata prodotta durante la frequenza del Corso di Dottorato in Scienze Veterinarie dell'Università degli Studi di Sassari, A.A. 2018/2019 – XXXII ciclo, con il sostegno di una borsa di studio finanziata con le risorse del P.O.R. SARDEGNA F.S.E. 2014-2020 Asse III - Istruzione e Formazione - Obiettivo Tematico 10 “Investire nell’istruzione, nella formazione e nella formazione professionale per le competenze e l’apprendimento permanente”.

Elisabetta Pintore

“Fasciola hepatica in Sardegna: caratterizzazione fenotipica, valutazione dell’andamento climatico sulla stagionalità, trasmissione e diffusione della parassitosi”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Sassari

Sommario

Ringraziamenti	6
Abstract	7
Introduzione.....	8
Origine ed evoluzione delle fasciole	9
Sistematica e morfologia di <i>Fasciola hepatica</i> :	10
Descrizione Morfologica:	10
Ciclo biologico	12
Ospiti intermedi ed ospiti definitivi.....	14
<i>Lymnaea</i> in Sardegna.....	15
Fattori climatici che influenzano la stagionalità e trasmissione della fasciolosi.	16
Importanza economica della Fasciolosi.....	18
Trattamenti farmacologici	18
Epidemiologia e cenni storici della fasciolosi in Sardegna	18
Obiettivi dello studio	20
Materiali e Metodi	21
Area di studio	21
Siti di campionamento.....	22
Campionamenti.....	23
Studio fenotipico delle fasciole.	24
Fissazione	24
Colorazione.....	24
Diafanizzazione	25
Disidratazione.....	25
Montaggio.....	25
Tecniche di misurazione: studio morfometrico CIAS	26
Metodi statistici:	28
Analisi delle componenti principali (ACP)	28
Analisi dei fattori canonici	29
Meteorologia.....	31

Elisabetta Pintore

“*Fasciola hepatica* in Sardegna: caratterizzazione fenotipica, valutazione dell’andamento climatico sulla stagionalità, trasmissione e diffusione della parassitosi”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Sassari

3

Omogeneità o eterogeneità climatica della Sardegna	33
Stagionalità nella trasmissione della distomatosi	33
Analisi dell'Impatto del cambiamento climatico.....	34
Risultati	35
Studio fenotipico delle fasciole della Sardegna.....	35
Fenotipizzazione di <i>F. hepatica</i> negli ovini	35
Fenotipizzazione di <i>F. hepatica</i> nei Bovini.....	39
Meteo.....	43
Studio della omogeneità o eterogeneità tra le aree esaminate.	43
Stazione meteorologica di Alghero	44
Stazione meteorologica di Capo Bellavista	45
Stazione Meteorologica di Capo Carbonara.....	46
Stazione meteorologica di Capo Frasca.....	47
Stazione Meteorologica di Decimomannu.....	48
Stazione meteorologica di Olbia.....	49
Stazione meteorologica di Perdasdefogu.....	50
Studio della stagionalità.....	51
Stazione Meteorologica di Alghero	51
Stazione meteorologica di Capo Bellavista	52
Stazione meteorologica Capo Carbonara.....	52
Stazione meteorologica di Capo Frasca.....	53
Stazione Meteorologica di Decimomannu.....	53
Stazione meteorologica di Olbia	54
Stazione meteorologica di Perdasdefogu.....	54
MT riepilogo tutte le stazioni	55
Impatto del cambio climatico	56
Stazione meteorologica di Alghero	57
Stazione meteorologica di Capo Bellavista	58
Stazione Meteorologica di Capo Carbonara	59
Stazione Meteo di Capo Frasca	60

Elisabetta Pintore

“Fasciola hepatica in Sardegna: caratterizzazione fenotipica, valutazione dell’andamento climatico sulla stagionalità, trasmissione e diffusione della parassitosi”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Sassari

4

Stazione Meteorologica di Decimomannu.....	61
Stazione Meteorologica di Olbia	62
Stazione Meteo di Perdasdefogu	63
Discussione.....	64
Studio fenotipico di <i>Fasciola hepatica</i> in Sardegna.....	64
<i>F. hepatica</i> negli ovini.....	64
<i>F. hepatica</i> nei bovini.....	65
Studio della Climatologia	66
Studio della eterogeneità e della stagionalità.....	66
Temperature.....	66
Umidità	67
Evapotraspirazione	67
Stagionalità: Indice di previsione MT	67
Cambiamento climatico.....	68
Conclusioni.....	70
Bibliografia.....	72

Ringraziamenti

Questo studio comparativo è stato possibile grazie al materiale parassitologico messo a disposizione dal Centro di Referenza dell'OMS per la Fasciolosi ed i suoi molluschi vettori presso la Facoltà di Farmacia dell'Università di Valencia-Burjassot. Si ringraziano la Professoressa Maria Dolores Bargues, la Professoressa Maria Adela Valero ed in particolare il Prof. Santiago Mas-Coma, di fondamentale aiuto sia per scelta degli argomenti da sviluppare che per la stesura sia della tesi. Si ringrazia l'Aeronautica Militare, Comando Squadra Aerea, Stato Maggiore-Reparto per la meteorologia, per aver fornito i dati meteorologici giornalieri dettagliati indispensabili per l'analisi della climatologia degli ultimi trent'anni in Sardegna. Si ringrazia il Dottor Alessandro Delitala e il Dr. Michele Fiori per l'aiuto nell'analisi di tali dati. Inoltre si ringraziano tutti i colleghi che hanno partecipato attivamente al progetto aiutandomi a collezionare i campioni utilizzati per questo lavoro. Ultimo ma più importante ringraziamento al mio Tutor, il Prof. Garippa per il suo aiuto, la sua pazienza la sua comprensione ed i suoi consigli.

Abstract

Fascioliasis is a widely distributed parasitic disease caused by the two trematode species *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*. Fascioliasis is responsible for high losses in livestock productions. The dependence of *F. hepatica* and its intermediate hosts from weather factors, indicate that climate changes may affect the evolution of this disease. *F. hepatica* is currently the only species of Fasciolidae present in Sardinia. Intermediate hosts belong to the *Lymnaea* species and *Lymnaea truncatula* is the main intermediate host.

Sardinia, due to its geographical position, can represent a model for the study of fascioliasis transmission and evolution throughout the Mediterranean area.

This study describes for the first time the phenotypic characterization of adults of *F. hepatica* sampled from sheep and cattle from Sardinia, through a computerized image analysis system (CIAS) used for the differentiation of both species. The results compared with standard populations of *F. hepatica* (from South America and Europe) and *F. gigantica* (from Egypt for sheep and Burkina Faso for cattle), show that in Sardinia there are no *F. gigantica* or hybrid forms. The analysis of the meteorological data of the last thirty years (1988-2017) show that Sardinia is a climatically heterogeneous region with a seasonality of transmission of *F. hepatica* (from October to April). The data analysis also allowed us to highlight a possible climatic change especially in the south-western area of Sardinia.

Elisabetta Pintore

“*Fasciola hepatica* in Sardegna: caratterizzazione fenotipica, valutazione dell’andamento climatico sulla stagionalità, trasmissione e diffusione della parassitosi”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Sassari

7

Introduzione

Con il termine fasciolosi si indica una patologia parassitaria causata da un trematode del genere *Fasciola*. La principale specie implicata in tale patologia risulta essere *Fasciola hepatica* in considerazione della sua distribuzione a livello mondiale. La seconda specie è *Fasciola gigantica* circoscritta nell'area del Vecchio Continente (Mas-Coma & Bargues, 1997). Ambedue le specie sono caratterizzate da un ciclo indiretto che necessita della presenza di un ospite intermedio, un gasteropode d'acqua dolce della Famiglia Lymnaeidae (Bargues, 2001). La fasciolosi ha un forte impatto economico sul comparto zootecnico rendendosi responsabile di ingenti perdite produttive e potendo causare, nei casi di infestazioni massive, la morte degli animali infestati. Nell'ambito della Sanità Pubblica, fino alla fine degli anni '90 la fasciolosi umana veniva considerata una zoonosi non rilevante con circa 2.000 casi riportati tra il 1970 ed il 1990 (Chen, 1990). Tuttavia, studi effettuati dal WHO inizialmente in Corsica e successivamente nell'altopiano Boliviano, mettevano in luce come la fasciolosi umana fosse una patologia molto più frequente di quanto evidenziato in precedenti indagini (Mas-Coma, 1999; 2008).

Negli animali ed in particolare nella specie ovina la distomatosi sostenuta da *F hepatica* si può manifestare sia in forma acuta che cronica. Durante la fasciolosi acuta (corrispondente al periodo di invasione delle adolescarie) si verificano ipertermia, epatite acuta di tipo traumatico, algia addominale, disturbi digestivi ed episodi diarroici, abbattimento, anoressia ed anemia. Nei casi di infestazione massiva l'animale può andare incontro a morte nel giro di pochi giorni. La fase cronica (corrispondente alla permanenza dei parassiti adulti all'interno dei dotti biliari) è caratterizzata da progressivo dimagrimento, diarrea e spesso anemia e subittero. Negli ovini può causare anche perdita della lana. La continua presenza delle fasciole all'interno dei dotti provoca alterazioni epatiche sia di tipo strutturale che di tipo funzionale che esitano spesso in cirrosi. Durante tale fase possono comparire quindi edemi discrasici nelle parti più declivi del corpo. Caratteristico è l'edema sottomandibolare. (Taylor et al., 2010; <http://www.federica.unina.it/medicina-veterinaria/antropozoonosi-parassitarie/fasciola-hepatica/>).

Elisabetta Pintore

"*Fasciola hepatica* in Sardegna: caratterizzazione fenotipica, valutazione dell'andamento climatico sulla stagionalità, trasmissione e diffusione della parassitosi"

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Sassari

Origine ed evoluzione delle fasciole

La particolare composizione della famiglia Fasciolidae, con nove specie, distribuite in tre sottofamiglie che includono cinque generi mono-specifici e un solo genere multi-specifico, suggerisce che si tratti di un'antica famiglia in cui molti membri sono scomparsi nel corso dell'evoluzione. Questa evoluzione ha permesso alla Fam. Fasciolidae di espandersi nel Vecchio Continente esclusivamente con l'unica specie *Fascioloides magna*, che dimostra un'origine nella Regione Neartica. L'assenza di membri della Fam. Fasciolidae nella Regione Neotropica (tutti gli studi indicano che la presenza di *F. hepatica* in Sud America sia la conseguenza di una recente introduzione dovuta all'uomo) sostiene la teoria dell'origine di detta famiglia dopo la frammentazione del Gondwana in Africa e Sud America avvenuta circa 90-100 milioni di anni fa (Pitman et al., 1993). I risultati di un recente studio filogenetico supportano l'evoluzione logica dei membri della famiglia Fasciolidae, a partire inizialmente dall'Africa con una successiva diffusione in Asia e nel resto della Regione Oloartica e con un progressivo adattamento al microhabitat epatico ed alla trasmissione da parte dei gasteropodi d'acqua dolce (Lotfy et al., 2008). L'origine di *F. hepatica* in Eurasia è generalmente accettata in considerazione dell'evidente affinità di questa specie per *Lymnea/Galba truncatula* che hanno caratteristiche ecologiche legate a climi miti e freddi (Mas-Coma & Bargues, 1997). Per quanto riguarda la relazione con l'ospite definitivo, dati comparativi su infestività, durata della vita, potenziale biotico e risposta immunitaria indicano che *F. hepatica* abbia più affinità con la specie ovina che con altre specie ospite. Negli ovini, la durata della vita di *F. hepatica* può arrivare fino a 11 anni, la produzione di uova da parte degli adulti è relativamente alta e non ci sono prove che pecore o capre acquisiscano immunità nei confronti di *F. hepatica*. Nei bovini, la malattia è autolimitante, la maggior parte dei parassiti viene eliminata entro 9-12 mesi, la durata della produzione di uova è breve e il picco massimo di eliminazione dura solo per poche settimane. La resistenza viene acquisita durante l'infestazione primaria (Boray, 1969; Dawes & Hughes, 1964; Mas-Coma & Bargues, 1997; Spithill et al., 1999). Questi dati suggeriscono che *F. hepatica* si sia adattata inizialmente in ovini e caprini eurasiatici preferibilmente nella specie ovina.

Le specie appartenenti alla Famiglia Lymnaeidae sembrano essere un gruppo di gasteropodi molto antico. L'esistenza di tre gruppi di gasteropodi acquatici raggruppati in base alle lunghezze di ITS-2,

con il genere *Galba* che presenta le sequenze più brevi, è già stato evidenziato da Bargues et al. nel 2001. Il più antico fossile conosciuto è una *Galba* risalente al Giurassico, tra 146 e 208 milioni di anni fa (Zilch, 1959). Ciò suggerisce che un ITS-2 più breve sarebbe la condizione plesiomorfa e che, durante l'evoluzione dei gasteropodi si sia verificato un aumento della sua lunghezza. In questo modo, sia *Radix* che *Galba* possono essere considerati i taxa più antichi (con una lunghezza di ITS2 di 370–406 bp), *Lymnaea s. str.*, *Stagnicola* e *Omphiscola* europee (lunghezza ITS2: 468–491 bp) i più recenti e *Stagnicola* e *Hinkleyia* americane quelli intermedi (lunghezza ITS 2 434–450 bp) (Bargues et al., 2001). Questa ipotesi concorda con i dati dell'unica filogenesi proposta da Inaba (1969) che si basa su dati paleontologici, numeri cromosomici e dentizione della radula.

Sistematica e morfologia di *Fasciola hepatica*:

La classificazione tassonomica di questo trematode è la seguente (Taylor et al., 2010)

Phylum: Platyhelminthes 1872

Classe: Trematoda 1808

Subclasse: Digenea

Ordine Echinostomstida

Famiglia Fasciolidae

Genere *Fasciola*

Specie *Fasciola hepatica*

Descrizione Morfologica:

I parassiti adulti, di colore bruno presentano la classica forma "a foglia di alloro" appiattita dorso-ventralmente. Raggiungono lunghezze comprese tra 20 e 30 mm e larghezza variabile tra 6 e 13 mm (Mas-Coma et al., 1997). La superficie del parassita adulto si presenta ricoperta da piccole spine rivolte caudalmente che hanno la funzione sia di mantenere in posizione il parassita all'interno dei dotti biliari che di favorire l'erosione dell'epitelio duttale e dei vasi sanguigni. Al di sotto del tegumento spinoso si trovano i fasci muscolari. L'adulto ha due ventose: la ventosa orale, posta all'estremità anteriore del corpo che circonda l'apertura buccale e la ventosa ventrale o *acetabulum*

Elisabetta Pintore

"*Fasciola hepatica* in Sardegna: caratterizzazione fenotipica, valutazione dell'andamento climatico sulla stagionalità, trasmissione e diffusione della parassitosi"

posta sulla faccia ventrale del parassita. Non esiste una vera e propria cavità interna ma gli organi sono immersi in una matrice parenchimatosa. L'apparato digerente è semplice, con l'apertura orale seguita dal prefaringe, faringe, esofago e intestino. Quest'ultimo si biforca a poca distanza dalla ventosa orale formando rami primari e secondari che si estendono fino alla porzione caudale del corpo. Le due branche intestinali terminano a fondo cieco.

L'apparato escretore consiste in numerose cellule a fiamma fornite di ciglia che spingono i detriti metabolici lungo un sistema di tubuli confluenti in un collettore unico che sbocca all'esterno nella porzione terminale del corpo (Fairweather et al., 1999). Il sistema nervoso è semplice e formato da un paio di fasci longitudinali connessi anteriormente a due gangli.

Sono trematodi ermafroditi ed è possibile sia l'autofecondazione che la fecondazione crociata.

Il poro genitale si apre anteriormente rispetto alla ventosa ventrale (Quiroz, 2000; Urquhart & Armour, 2001).

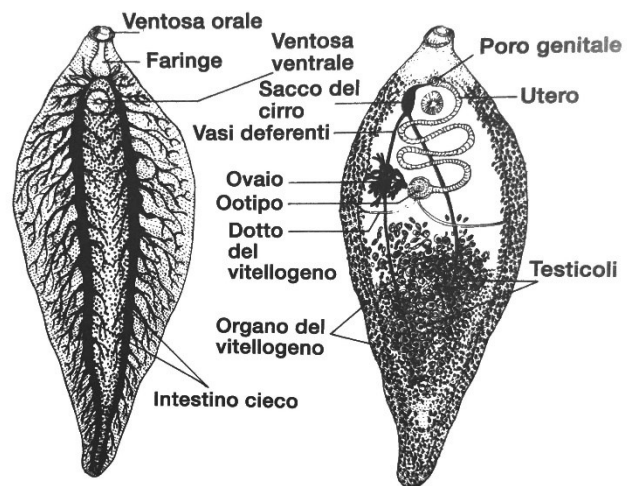


Immagine 1.(Tavlor.2010)

L'apparato genitale femminile è costituito da un unico ovaio ramificato (situato al lato destro del corpo del parassita posteriormente all'acetabolo) dal quale si diparte l'ovidutto che si espande distalmente per formare l'ootipo dove la cellula uovo si unisce al secreto delle ghiandole vitellogene (la cui funzione è quella di formare sostanza di riserva) e dove si realizza la formazione del guscio. Dall'ootipo si diparte l'utero, ricco di tubuli ondulati dove, durante il tragitto, il guscio dell'uovo si indurisce e diventa resistente. L'uovo viene espulso attraverso il poro genitale che si trova adiacente alla ventosa ventrale. L'uovo maturo si presenta opercolato, ovalare di colore giallo per la presenza di tannini e non embrionato al momento della sua espulsione. Le dimensioni medie variano da 130-150 µm di lunghezza e 60 -90 µm di diametro (Taylor et al., 2010). Le uova di *F. hepatica* non sono morfologicamente distinguibili dalle uova di *F. gigantica* in quanto la loro dimensione dipende

soprattutto dalla specie dell'ospite definitivo nel quale alberga il parassita (Valero et al., 2001; 2002; 2009).

L'apparato riproduttore maschile è costituito da due testicoli, uno anteriore e uno posteriore che occupano una considerevole porzione corporea. Dai testicoli si dipartono i dotti efferenti che si dirigono anteriormente e si uniscono a formare i dotti deferenti che sboccano nella tasca del cirro contenente sia la vescicola seminale che il cirro, un particolare tipo di pene primitivo (Olsen, 1977). La tasca del cirro comunica con l'esterno attraverso il poro genitale (Taylor, 2010).

Ciclo biologico

Il ciclo biologico, descritto per la prima volta nel 1883 (Thomas, 1883) si può dividere in due fasi: una di riproduzione sessuata nell'ospite definitivo e una asessuata nell'ospite intermedio. Ha una durata variabile tra le 14 e le 23 settimane (Mas-Coma et al., 2014).

Esso si sviluppa in 7 fasi (Pexioto, 2016):

- sviluppo dell'adulto nell'ospite definitivo
- eliminazione delle uova dall'ospite definitivo
- sviluppo dell'uovo nell'ambiente
- formazione del miracidio e ricerca dell'ospite intermedio nell'acqua
- sviluppo degli stadi larvali (sporocisti e redie) nell'ospite intermedio
- fuoriuscita delle cercarie dalle lumache e incistamento
- ingestione delle metacercarie da parte dell'ospite definitivo.

All'interno dei dotti biliari un parassita adulto depone tra 8.000 e 25.000 uova al giorno. Nonostante i trematodi siano ermafroditi, si ritiene che la fecondazione crociata sia la forma di riproduzione più frequente (Chen, 1990). Nei dotti biliari, i parassiti adulti eliminano le uova che, con la bile, raggiungono l'intestino e arrivano nel mondo esterno con le feci. A seconda dell'umidità, le uova

Elisabetta Pintore

"*Fasciola hepatica* in Sardegna: caratterizzazione fenotipica, valutazione dell'andamento climatico sulla stagionalità, trasmissione e diffusione della parassitosi"

possono mantenersi vitali nelle feci per un periodo variabile da una settimana ad alcuni mesi. Nell'ambiente esterno le uova maturano e in condizioni ottimali di temperatura (22-26°C) e (Ollerenshaw, 1959) (Thomas, 1883), schiudono in 9-10 giorni, liberando un miracidio ciliato. (Thomas, 1883). Quando la temperatura è prossima ai 10°C il completo sviluppo richiede 6 mesi, mentre se la temperatura è di circa 30°C sono necessari solamente 8 giorni pur in presenza di un aumento esponenziale della mortalità delle uova (Andrews, 1999). Quando le uova si attivano, anche sotto l'influsso della luce, il miracidio riesce ad alterare la permeabilità della parete dell'uovo incrementando la pressione interna e causando così l'apertura dell'opercolo (Wilson, 1969). Il miracidio sopravvive per circa 24 ore (ad una temperatura di 10°C) entro le quali deve incontrare l'ospite intermedio per proseguire. Se la temperatura si aggira sui 6°C il miracidio può sopravvivere fino a 36 ore mentre se questa supera i 25°C, la sopravvivenza del miracidio si riduce drasticamente a circa 6 ore (Rowcliffe & Ollerenshaw, 1960). Il miracidio penetra attivamente nel piede del gasteropode, perdendo le ciglia e trasformandosi in sporocisti. Nel mollusco si verifica una fase di riproduzione asessuata che continua attraverso gli stadi di sporocisti e di redia, fino a quello finale di cercaria. In caso di condizioni ambientali sfavorevoli, anziché cercarie, le redie producono redie figlie (prima generazione) e queste producono altre redie (seconda generazione) da cui origineranno le cercarie (Cawdery et al., 1978). Queste abbandonano il mollusco sotto forma di cercaria e una volta nell'ambiente esterno raggiungono, grazie alla coda mobile, i vegetali ai quali si fissano incistandosi per trasformarsi in metacercaria infestante. Il completamento dello sviluppo da miracidio a metacercaria si realizza in circa 6-7 settimane; tuttavia, in presenza di condizioni climatiche sfavorevoli, il ciclo può richiedere diversi mesi. L'infestazione del gasteropode con un solo miracidio può portare alla formazione da 10 a 700 metacercarie. Queste, ingerite dall'ospite definitivo, subiscono due fasi di attivazione: la prima avviene nel ruminale o stomaco a causa della temperatura e della concentrazione di CO₂; la seconda avviene nel duodeno dove la presenza di enzimi e acidi biliari favorisce il disincistamento del parassita che penetra quindi attraverso la mucosa intestinale, passa in cavità peritoneale (in 24 ore) migra fino ad arrivare al fegato perforando la sierosa epatica. Le adolescenti lunghe 1-2 mm e di forma lanceolata (Taylor, 2010), migrano nel parenchima epatico per circa 6-8 settimane e raggiungono prima i dotti biliari di piccolo calibro e successivamente quelli

Elisabetta Pintore

"*Fasciola hepatica* in Sardegna: caratterizzazione fenotipica, valutazione dell'andamento climatico sulla stagionalità, trasmissione e diffusione della parassitosi"

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Sassari

13

principali, nei quali raggiungono la maturità sessuale (Andrews, 1999). Il periodo di prepatenza è di 6 settimane nei ratti, 8-10 nell'ovino e 12-15 settimane nel bovino (Pexioto, 2016). Una volta diventati adulti i trematodi possono sopravvivere per un periodo variabile tra i 9 e i 12 mesi nei vitelli, fino ad 11 anni negli ovini e da 9 a 13 anni nell'uomo (Mas-Coma et al., 2014).

Ospiti intermedi ed ospiti definitivi

F. hepatica è un parassita cosmopolita a localizzazione epatica degli ovini, caprini, bovini, equidi cervidi ed altri mammiferi inclusi l'uomo (Taylor, 2010). Questa specie di trematodi presenta un ciclo biologico indiretto e riconosce come ospite intermedio il gasteropode di acqua dolce del genere *Lymnaea*. La specie più comune è *L. truncatula*, lumaca d'acqua dolce ampiamente distribuita a livello mondiale. Altre specie di ospiti intermedi in aree extraeuropee sono: *Lymnaea tormentosa* (Australia e Nuova Zelanda); *L. columella* (Nord America, America Centrale, Australia Nuova Zelanda); *L. bulimoides* (Sud America, Nord America, Caraibi); *L. humilis*: (Nord America); *L. viator* *L. diaphena*, *L. cubensis* (Sud America) *L. viridis* (Cina, Papua Nuova Guinea) (Taylor, 2010). È importante sottolineare come la trasmissione della fasciola cambi a seconda delle specie di *Lymnaea*. Sono presenti gasteropodi che non consentono la prosecuzione del ciclo pur albergando le forme di sviluppo, altri che sono ospiti competenti solo per *F. hepatica* e altri solo per *F. gigantica*. Pochissimi altri ospiti intermedi quale ad esempio *Pseudosuccinea columnella* sono in grado di trasmetterle entrambe (Bargues et al 2011). (Bargues et al., 2011). *F. hepatica* è trasmessa da gasteropodi del genere *Lymnaea* (*Galba*). *L. truncatula* (*Galba*) *truncatula* (Bargues et al., 2007; 2011) è l'ospite principale, e secondo alcuni autori, unico ospite intermedio competente in Europa, Africa, Asia e Sud America. In Australia l'ospite intermedio è invece rappresentato da *L. tormentosa*. In Sardegna invece nonostante il principale ospite intermedio sia rappresentato da *L. truncatula*, anche *Lymnaea palustris* sembra possa fungere da ospite intermedio. (Giovannola, 1938; Arru & Papadopulos, 1971)

La presenza degli ospiti intermedi fornisce informazioni circa la distribuzione geografica della fasciolosi e può spiegare la presenza della parassitosi negli animali e nell'uomo all'interno di un paese, come ad esempio in Venezuela (Bargues et al., 2011) e Cile (Artigas et al., 2011). Come per altre malattie parassitarie i focolai di trasmissione si presentano quindi a "macchia" all'interno di una zona endemica.

Elisabetta Pintore

"*Fasciola hepatica* in Sardegna: caratterizzazione fenotipica, valutazione dell'andamento climatico sulla stagionalità, trasmissione e diffusione della parassitosi"

L. truncatula è un piccolo gasteropode che da adulto misura circa 1 cm di lunghezza. La conchiglia si presenta di solito di colore marrone scuro e spiralizzata. Quando posta in posizione verticale con l'apice verso l'altro e l'apertura rivolta verso l'osservatore questa risulta essere posizionata a destra misurando circa la metà dell'altezza del gasteropode stesso con in genere 4 o 5 spire destrorse. Si tratta di molluschi anfibi e pertanto trascorrono la maggior parte del loro tempo in acqua, riemergendo periodicamente dal fango circostante e dai terreni stagnanti. Hanno la capacità di resistere a climi molto secchi e molto freddi interrandosi profondamente ma senza riprodursi. Le condizioni ottimali sono caratterizzate da un pH del terreno leggermente acido e da ambienti con acque a lento decorso e temperature comprese fra i 22 e 25°C. (Taylor, 2010).

I trematodi adulti vivono all'interno dei dotti biliari e della cistifellea degli ospiti definitivi: ovini caprini bovini equidi e camelidi e cervidi marsupiali e lagomorfi uomo compreso (Boray 1969; (Arru, et al., 1967).

I principali ospiti sono ovini, caprini, bovini, equidi, cervidi ed altri mammiferi domestici e selvatici del vecchio e nuovo continente nonché l'uomo. Marsupiali, conigli, lepri e nutrie sono comunque ospiti suscettibili. Il mostra una resistenza elevata nei confronti dei danni epatici che tale patologia può recare (Mas-Coma et al., 1997). Il comparto ovino e bovino è quello che maggiormente subisce i danni causati da *F. Hepatica* (*gigantica* per bufalo). Tra gli ospiti definitivi selvatici in Europa *F. hepatica* si è adattata meno al capriolo (*Capreolus capreolus*) rispetto ad altri cervidi. La nutria è considerato un importante reservoir in Francia e probabilmente anche in alcune aree del Sudamerica. L'uomo risulta suscettibile per entrambe le specie di *Fasciola* (Mas-Coma, 2009).

Lymnaea in Sardegna

I gasteropodi acquatici rappresentano una piccola percentuale dei gasteropodi della Sardegna (Arru & Papadopulos, 1971). *L. truncatula* è stata riscontrata per la prima volta nel 1969 (Arru et al., 1969). *L. palustris* può sicuramente essere invece considerata la specie più diffusa tra i gasteropodi d'acqua dolce. Si reperta con più facilità nelle anse dei fiumi dove il corso d'acqua è rallentato e fino a 400-500m di altitudine (Giovannola, 1938). *L. truncatula* è invece meno diffusa e si osserva ad altitudini fra 200 e 500 m.s.l.m. negli stessi luoghi in cui si possono ritrovare le *L. palustris*. Il suo habitat trova

Elisabetta Pintore

"*Fasciola hepatica* in Sardegna: caratterizzazione fenotipica, valutazione dell'andamento climatico sulla stagionalità, trasmissione e diffusione della parassitosi"

comunque notevoli limitazioni a causa della debole e stagionale portata dei corsi d'acqua e della scarsità delle piogge. La sua presenza risulta pertanto circoscritta ad aree pianeggianti, poco permeabili (argillose) che si allagano nel periodo invernale e si seccano nel periodo estivo ricoprendosi di vegetazione propria dei luoghi umidi. Durante i periodi invernali, gli autori riportano il ritrovamento di esemplari di dimensioni tra gli 8 e i 27 mm, probabilmente appartenenti a diverse generazioni (Arru & Papadopulos, 1971). Gli stessi autori riportano come la nuova generazione compaia a fine marzo, raggiungendo dimensioni di circa 10 mm nel mese di aprile arrivando al completo sviluppo nel mese di maggio. Altre tre generazioni sono state riscontrate a due mesi di distanza circa l'una dall'altra a fine maggio, luglio e settembre. Sempre Arru & Papadopulos (1971) hanno dimostrato come, infestando sperimentalmente alcune specie di gasteropodi acquatici, solamente *L. palustris* e *L. truncatula* permettessero il completamento del ciclo biologico.

Fattori climatici che influenzano la stagionalità e trasmissione della fasciolosi.

I fattori climatici, in particolare la temperatura, le precipitazioni l'umidità e l'evapotraspirazione potenziale, sono decisivi per la trasmissione di *F. hepatica* (Mas-Coma et al., 2009). Principalmente, le variazioni delle precipitazioni e la temperatura sono alla base della differente stagionalità della fasciolosi. In Europa questa parassitosi ha un andamento tipicamente bistagionale collegato tipicamente all'attività degli ospiti intermedi: primavera e autunno. In altre aree può avere un andamento monostagionale, o addirittura essere presente tutto l'anno come in Bolivia, dove le condizioni climatiche di pioggia umidità e temperatura permettono ai gasteropodi di sopravvivere tutto l'anno (Mas-Coma et al., 1999). *L. truncatula* preferisce piccoli corsi d'acqua (Fromming, 1956) e sopravvive più facilmente in terreni argillosi che trattengono maggiormente l'acqua piuttosto che in terreni sabbiosi maggiormente drenanti (Ollerenshaw et al., 1969). L'infestazione da *F. hepatica* è quindi anche strettamente correlata alle condizioni del suolo che possono essere suddivise in quattro categorie: la categoria 4 indica un suolo umido ottimale per la trasmissione della parassitosi, ad essa è attribuito il rischio massimo. La categoria 3 rappresenta il suolo con molta vegetazione ed esso viene attribuito un rischio pari al 75%. La categoria 2 indica un terreno asciutto con poca vegetazione che ritarderà o ridurrà la trasmissione (rischio 25%). La categoria 1 è rappresentata da zone pietrose con vegetazione trascurabile in cui non si verifica alcuna trasmissione di *F. hepatica* con rischio

Elisabetta Pintore

"*Fasciola hepatica* in Sardegna: caratterizzazione fenotipica, valutazione dell'andamento climatico sulla stagionalità, trasmissione e diffusione della parassitosi"

considerato nullo. Anche la scarsità dell'irraggiamento solare può avere effetti negativi sulla presenza di *Lymnea spp.* perché riduce la crescita delle alghe di cui questi gasteropodi si nutrono (Petzold, 1989). La riproduzione di *L. truncatula* segue una stagionalità dipendente dalle condizioni climatiche del luogo nel quale essa vive (sono capaci di dare vita a 100 mila nuovi gasteropodi nel giro di 3 mesi). Esistono numerosi modelli basati sulle precipitazioni mensili che possono predire la stagionalità del rischio di infestazione. (Ollerenshaw & Rowlands, 1959; Ollerenshaw et al., 1969; Ross, 1970; Malone et al., 1987). Le precipitazioni hanno un effetto positivo sia sulle fasi a vita libera di *F. hepatica* sia sugli ospiti intermedi. Ciò significa che il rischio aumenta all'aumentare delle precipitazioni con un rischio massimo approssimativamente ai 90 mm di pioggia al mese (Rapsh, 2008). Tuttavia precipitazioni molto abbondanti possono avere un effetto negativo sia sugli ospiti intermedi che sul parassita stesso separandoli tra di loro e inibendo quindi la trasmissione. Dunque livelli superiori a 210 mm possono ridurre notevolmente il rischio di trasmissione della parassitosi (Rapsh, 2008). Temperature comprese tra 22 e 25° C determinano il rischio massimo di trasmissione dell'infestazione poiché ottimali per lo sviluppo di *L. truncatula* (Williamson, 1978). Partendo da un rischio del 30% a 10°C esso raggiunge un rischio dell'85% a temperature di 18°C. Oltre i 25°C il rischio declina rapidamente e si approssima allo 0 (Rapsh, 2008). Allo stesso modo né le uova né i gasteropodi sviluppano al di sotto di 10 gradi di temperatura. I fattori climatici hanno ripercussioni anche sulle forme a vita libera del parassita. La curva di rischio temperatura-dipendente delle metacercarie invece è più complessa: a temperature tra 2-5°C il 10% di esse sopravvive per un anno e tra 12 e 14°C il 10 % sopravvive per 6 mesi. A 20°C si stima che il 60% abbia una sopravvivenza di 8 settimane. La curva di rischio ridiscende a temperature di 25°C (35%) con tempi di sopravvivenza di 6 settimane. La sopravvivenza è invece inibita a temperature superiori ai 25°C (Rapsh, 2008; Andrews, 1999). Anche l'umidità e la pioggia sono fattori fondamentali per la riproduzione e lo sviluppo degli ospiti intermedi (Fromming, 1956).

Importanza economica della Fasciolosi.

La fasciolosi può colpire un elevato numero di animali, in particolar modo i ruminanti in produzione zootecnica. Infestazioni acute con cariche elevate possono causare anche la morte dell'ospite definitivo, soprattutto se appartenenti alla specie ovina e caprina. Possono anche rendersi responsabili di diminuzioni di fertilità, di produzioni di latte, carne lana così come della capacità di lavoro. Tutte queste caratteristiche fanno sì che la fasciolosi venga annoverata come una delle maggiori parassitosi a maggiore impatto economico mondiale (Cwiklinski et al., 2005).

Trattamenti farmacologici

Diversi farmaci sono registrati per il controllo di tale patologia negli animali da reddito, come benzimidazolici, (triclabendazolo, albendazolo), salicilanilidi (closantel) e benzensulofonamidi (clorsulon). Tra tutte solo il triclabendazolo ha dimostrato un'elevata efficacia sia sui parassiti adulti che sulle forme immature mentre gli altri farmaci hanno efficacia su trematodi di oltre sei settimane post infestazione (Kelley et al., 2016). Per questo motivo il triclabendazolo è diventato il farmaco di scelta in particolare per il trattamento negli ovini anche se ciò ha inevitabilmente condotto ad un aumento dei fenomeni di farmacoresistenza (Beesley, 2017).

Epidemiologia e cenni storici della fasciolosi in Sardegna

Nel 1932 il Prof. Arturo Carta per primo in Sardegna affronta lo studio della parassitosi descrivendo le alterazioni delle linfoghiandole periportalì nella distomatosi epatica. Giovannola (1938) studiando la malacofauna dei corsi di acqua situati in vicinanza dei principali centri costieri e a seguito del riscontro delle forme larvali del parassita in 15 su 229 esemplari di *Lymnaea palustris* raccolti lungo il fiume di Ottava (SS) affermò come fosse "l'unico e normale ospite intermedio del parassita". Solo dopo 30 anni Mura e Arru (1968) segnalano per la prima volta nell'isola la presenza di *L. truncatula* e l'anno successivo Tanda e Arru (1969) evidenziano come questa fosse in realtà il principale ospite intermedio di *F. hepatica* nonostante *L. palustris* rimanesse comunque il gasteropode acquatico più diffuso in Sardegna (Coluzzi, et al., 1965). Nel 1967 viene descritta per la prima volta l'infestazione in 16 soggetti su 452 leporidi campionati durante le stagioni venatorie 1964-1967 della Sardegna (Arru, et al., 1967).

Elisabetta Pintore

"*Fasciola hepatica* in Sardegna: caratterizzazione fenotipica, valutazione dell'andamento climatico sulla stagionalità, trasmissione e diffusione della parassitosi"

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Sassari

Nel 1971 un ulteriore contributo allo studio della parassitosi fu dato da Arru e Papadopulos (1971) con un'indagine condotta al fine di accertare l'entità e la periodicità dell'infestazione naturale degli ospiti intermedi di *F. hepatica* ed in particolare di *L. truncatula* e l'azione del molluscicida Frescon per il loro controllo. Da sottolineare come questo sia stato il primo studio a porre in relazione la vita del mollusco con il clima e le peculiari situazioni geopedologiche e a valutare come l'infestazione degli ospiti definitivi di *F. hepatica* fosse legata ad una effettiva stagionalità dovuta biologia del mollusco gasteropode. Nel 1970 Arru e Deiana condussero i primi studi sull'azione del Rafoxanide primo farmaco realmente efficace nei confronti di *F. hepatica* (Arru & Deiana, 1970).

Infine Arru nel 1976 descrive la situazione epidemiologica della parassitosi in Sardegna sottolineando come “ *l'aumento delle aree umide in cui si repertano numerosi gli ospiti intermedi di F. hepatica adibite a pascolo in seguito all'esodo dei campi della popolazione rurale e la diminuzione degli allevamenti esclusivamente pastorali e la loro graduale sostituzione con allevamenti misti costituiti anche da bovini frequentemente infestati da F. hepatica si rendano responsabili dell'espansione della parassitosi negli ovini*”. Sottolinea come un efficace controllo della parassitosi debba basarsi non solo sul razionale utilizzo di farmaci fasciolicidi ma anche e soprattutto su quegli interventi che modificano gli habitat degli ospiti intermedi impedendone il completamento del ciclo biologico e la trasmissione della parassitosi.

Le prime indagini epidemiologiche di cui si ha documentazione bibliografica risalgono al 1955 con un lavoro di Pegreff (1955) che riporta come l'infestazione fino al 1935 colpisse circa il 90% dei bovini e degli ovini e come successivamente, grazie alla messa in atto campagne profilattiche condotte tra il 1935 e il 1942 la prevalenza fosse notevolmente ridotta fino a una ripresa nel 1955 arrivando a prevalenze del 30 e del 40% rispettivamente nei bovini e negli ovini. Un'indagine condotta negli anni 1960-62 su 11.075 ovini e 9.593 bovini regolarmente macellati in Sardegna evidenziava una prevalenza rispettivamente del 16% e del 31 % (Tanda & Arru, 1963).

Nel 1980 un'indagine basata su esami coprologici su ovini veniva rilevata una prevalenza della parassitosi del 26% (Arru et al., 1980). Una ricerca condotta nel 1988 in diversi mattatoi della Sardegna, in concomitanza con uno studio sull'idatidosi, per verificare la diffusione della distomatosi epatica negli ovini evidenziava una prevalenza del 2,23% per *F. hepatica* e dell'1,32% per

infestazioni sostenute contemporaneamente da *F. hepatica* e *Dicrocoelium dendriticum* (Arru, 1990) nettamente inferiori rispetto a quelle precedentemente riscontrate, nel 1963 (16%) e nel 1980 (26%). Tale calo viene spiegato con una notevole riduzione dell'habitat di *Lymnea* spp causato dall'aumento della siccità che a seguito delle opere di bonifica messe in atto negli anni associate ad un maggiore impiego di farmaci.

Esami copromicroscopici condotti nell'autunno 1992 su cavallini della Giara evidenziarono una prevalenza del 24,5% (Scala et al., 1992).

Più recentemente Scala et al. (2002) esaminavano 670 fegati ovini di razza sarda regolarmente macellati provenienti dalle provincie di Sassari e Cagliari rilevando con esami copromicroscopici eseguiti sugli stessi soggetti, una prevalenza per *F. hepatica* del 3%. I valori riscontrati evidenziavano l'assenza di differenze significative tra le prevalenze riscontrate nelle due provincie e che la diffusione della parassitosi non sembrava essere variata rispetto a quanto rilevato nel decennio precedente (Arru et al., 1990).

A tutt'oggi non è disponibile un quadro epidemiologico aggiornato sulla reale diffusione della parassitosi in Sardegna.

Dati non ufficiali fanno ritenere che negli ultimi anni la situazione sia pressochè stabile con prevalenze che non sembrano discostarsi da quelle rilevate dagli anni '90 in poi. Tuttavia, sono necessari nuovi studi per confermare quella che ad oggi rimane solamente un'ipotesi.

Obiettivi dello studio

Il primo obiettivo della presente tesi è quello di caratterizzare fenotipicamente le fasciole adulte campionate in differenti aree della Sardegna e di compararle con quelle "standard" (*F. hepatica* e *F. gigantica* provenienti da differenti aree geografiche dell'Europa, Africa e Sud America Spagna, Polonia, Egitto, Bolivia, Perù e Burkina Faso gentilmente concesse dal Centro di Referenza dell'OMS per la Fasciolosi e i suoi molluschi vettori al fine di valutarne affinità o differenze.

Il secondo è quello di analizzare l'andamento climatico degli ultimi trent'anni in Sardegna al fine di valutare:

- l'omogeneità o eterogeneità climatologica nelle diverse aree dell'isola;

Elisabetta Pintore

"Fasciola hepatica in Sardegna: caratterizzazione fenotipica, valutazione dell'andamento climatico sulla stagionalità, trasmissione e diffusione della parassitosi"

- l'esistenza di una stagionalità nella trasmissione di *F. hepatica*;
- se la presenza di modificazioni climatiche abbiano condizionato l'epidemiologia della parassitosi e possano per il futuro fornire indicazioni utili per valutare il rischio di trasmissione della parassitosi anche in considerazione del fatto che la Sardegna, data la sua posizione al centro del mediterraneo, possa essere utilizzata come modello di studio per le regioni che vi si affacciano.

Materiali e Metodi

Area di studio

La Sardegna è la seconda isola del Mediterraneo dopo la Sicilia. Si trova tra il 41° e il 39° parallelo ha una superficie di 24.100 km con 1,66 milioni di abitanti ed una densità di 69 abitanti per km². Misura 270 km di lunghezza (da Punta Falcone a nord a Capo Teulada a sud) e 145 km di larghezza (capo dell'Argentiera a ovest, Capo Comino ad Est). È localizzata al centro del bacino occidentale del Mediterraneo, separata ad Est dal continente italiano dal Mar Tirreno (188 km); a Sud dalla Tunisia dal Mar di Sardegna (178 km); a Nord dalla Corsica dalle Bocche di Bonifacio (11km); a Ovest, dalla penisola iberica e dalle isole Baleari dal Mar di Sardegna. I caratteri morfologici dell'isola rispecchiano la sua lunghissima storia geologica; le strutture predominanti del rilievo sono infatti rappresentate da altipiani e tavolati. Nel complesso, l'altezza media s.l.m. è di 334 m, mentre la sua cima più alta, Punta La Marmora nel massiccio del Gennargentu, raggiunge i 1834 s.l.m. Nonostante la superficie definibile come "montagna" rappresenti solo il 18% e la collina il 68% la Sardegna presenta un carattere prevalentemente montuoso, soprattutto dal punto di vista morfologico e pedologico per l'asperità, le pendenze e la limitata fertilità dei suoli. Le zone pianeggianti occupano il 18% del territorio: la pianura più estesa è il Campidano che separa i rilievi centro settentrionali dai monti dell'Iglesiente, mentre la piana della Nurra si trova nella parte nord-occidentale tra Sassari, Alghero e Porto Torres. I fiumi hanno prevalentemente carattere torrentizio: i più importanti sono il Tirso, il Flumendosa, il Coghinas, il Cedrino, il Temo ed il Flumini Mannu. Alcuni sono sbarrati da dighe che danno origine a laghi artificiali utilizzati principalmente per l'irrigazione. Il Baratz è l'unico

Elisabetta Pintore

"*Fasciola hepatica* in Sardegna: caratterizzazione fenotipica, valutazione dell'andamento climatico sulla stagionalità, trasmissione e diffusione della parassitosi"

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Sassari

21

lago naturale ed è situato a nord di Alghero. Le coste si estendono per 1.897 km. Nella parte ovest sono prevalentemente presenti coste alte, rocciose e con piccole insenature che a nord si incuneano nelle valli mentre i litorali bassi e sabbiosi, talvolta paludosi, si trovano in prevalenza nelle zone meridionali e orientali dove si trovano anche stagni costieri. Il clima tipico della Sardegna è quello mediterraneo e lungo le zone costiere, grazie alla presenza del mare, gli inverni sono miti e le estati calde e secche, caratterizzate da una notevole ventilazione. Nelle zone interne pianeggianti e collinari le temperature invernali sono più basse e quelle estive più alte rispetto alle aree costiere. Il clima è nel complesso abbastanza mite, ma durante l'arco dell'anno si possono avere valori minimi invernali di alcuni gradi al di sotto dello zero e massimi estivi anche superiori ai +40 C. Sui massicci montuosi in inverno non sono infrequenti le precipitazioni nevose e le temperature sotto lo zero, mentre nella stagione estiva il clima si mantiene abbastanza fresco. La Sardegna inoltre è una regione molto ventosa: i venti dominanti sono il Maestrale ed il Ponente (<https://it.wikipedia.org/wiki/Sardegna>).

Siti di campionamento

I parassiti sono stati campionati su ovini e bovini regolarmente macellati nel periodo febbraio-dicembre nelle seguenti località dell'isola (le uniche risultate positive nonostante la ricerca fosse estesa a tutta l'isola): Tempio Pausania, Villanova Monte Leone, Bonorva, Guspini/Ghilarza e Laconi (Fig. 1).

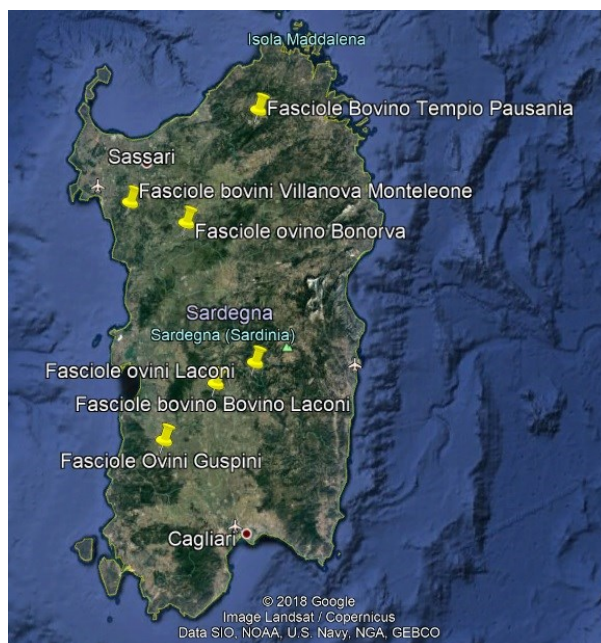


Figura.1 Località di campionamento delle fasciole

Elisabetta Pintore

"Fasciola hepatica in Sardegna: caratterizzazione fenotipica, valutazione dell'andamento climatico sulla stagionalità, trasmissione e diffusione della parassitosi"

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Sassari

Campionamenti

Tutte gli esemplari di *Fasciola* sono stati prelevati dai dotti biliari di animali naturalmente infestati. Il materiale è stato catalogato indicando zona di provenienza, data, ospite e numero di parassiti come riportato nella Tabella 1.

I campioni prelevati da ciascun ospite sono stati suddivisi in due aliquote. Le fasciole destinate alle analisi genotipiche (per un successivo lavoro) sono state fissate in alcol al 96%; quelle destinate alle analisi morfometriche sono state fissate in Bouin.

Codice	Specie	Provenienza		Data	Latitudine	Longitudine	Ospite	Numero campioni (*) Etanolo 96% (**) Bouin
		Regione	Area					
TUBE 1	<i>Fasciola</i>	Sardegna	Bonorva, SS	21-jun.-17	40°25'46.85"N	8°45'12.64"E	Ovino	n= 43**
TUBE 2	<i>Fasciola</i>	Sardegna	Tempio Pausania, OT	16-ago-17	40°52'57.66"N	9° 6'37.23"E	Bovino	n=3*
TUBE 3	<i>Fasciola</i>	Sardegna	Ghilarza, OR	01-sep.-17	39°33'6.31"N	8°37'11.93"E	Bovino	n=8*
TUBE4A	<i>Fasciola</i>	Sardegna	Laconi, OR	4-oct.-17	39°51'58.00"N	9° 7'60.00"E	Ovino	n=58*
TUBE4B	<i>Fasciola</i>	Sardegna	Laconi, OR	4-oct.-17	39°51'58.00"N	9° 7'60.00"E	Ovino	n=20 **
TUBE5A	<i>Fasciola</i>	Sardegna	Laconi, OR	4-oct.-17	39°51'58.00"N	9° 7'60.00"E	Ovino	n=17*
TUBE5B	<i>Fasciola</i>	Sardegna	Laconi, OR	4-oct.-17	39°51'58.00"N	9° 7'60.00"E	Ovino	n=10**
TUBE6A	<i>Fasciola</i>	Sardegna	Laconi, OR	4-oct.-17	39°46'39.82" N	8°55'34.64" E	Bovino	n=4*
TUBE6B	<i>Fasciola</i>	Sardegna	Laconi, OR	4-oct.-17	39°46'39.82"N	8°55'34.64"E	Bovino	n=4**
TUBE7A	<i>Fasciola</i>	Sardegna	Laconi, OR	21-oct.-17	39°51'58.00"N	9° 7'60.00"E	Ovino	n=4*
TUBE7B	<i>Fasciola</i>	Sardegna	Laconi, OR	21-oct.-17	39°51'58.00"N	9° 7'60.00"E	Ovino	n=12**
TUBE8A	<i>Fasciola</i>	Sardegna	Villanova Monteleone SS	28-oct.-17	40°30'09.00" N	8°28'16.00" E	Bovino	n=3*
TUBE8B	<i>Fasciola</i>	Sardegna	Villanova Monteleone SS	28-oct.-17	40°30'09.00" N	8°28'16.00" E	Bovino	n=2**
TUBE9A	<i>Fasciola</i>	Sardegna	Villanova Monteleone SS	28-oct.-17	40°30'09.00" N	8°28'16.00" E	Bovino	n=6*
TUBE9B	<i>Fasciola</i>	Sardegna	Villanova Monteleone SS	28-oct.-17	40°30'09.00" N	8°28'16.00" E	Bovino	n=6**

Tabella 1. Campionamento: località, data e specie ospite.

Su un totale di 86 fasciole fissate in Bouin ne sono state selezionate 83 poiché le restanti non risultavano integre. Le fasciole raccolte dagli animali provenienti da Tempio Pausania e da Ghilarza non sono state utilizzate per il presente studio.

Elisabetta Pintore

"*Fasciola hepatica* in Sardegna: caratterizzazione fenotipica, valutazione dell'andamento climatico sulla stagionalità, trasmissione e diffusione della parassitosi"

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Sassari

Studio fenotipico delle fasciole.

Fissazione

Al fine di permettere alla successiva osservazione microscopica una chiara visione di tutte le strutture interne del trematode, le fasciole venivano fissate in vivo in soluzione di Bouin. La soluzione di Bouin è un fissativo utilizzato in istologia su campioni immediatamente prelevati. È costituita da una soluzione acquosa di acido picrico, formalina 40% e acido acetico.

La procedura di fissazione viene di seguito descritta.

Ciascuna *Fasciola* è stata raccolta delicatamente mediante un pennello e posta su un vetrino portaoggetto leggermente bagnato con acqua. Dopo aver aggiunto una goccia di soluzione di Bouin facendo in modo che si distribuisse in maniera uniforme sul campione lo stesso è stato coperto con un vetrino coprioggetto esercitando una leggera pressione cercando di evitare un peso eccessivo per non causare lo schiacciamento e quindi la distorsione del parassita; tale fase aveva una durata di circa 20 minuti. Il parassita è stato trasferito in una piastra di Petri contenente Bouin dove è rimasto immerso per 30 minuti (Marcos, 1993). Tale procedura risulta necessaria per mantenere l'originale forma piatta del parassita indispensabile per le successive misurazioni. Le fasciole sono state sottoposte a risciacqui quotidiani in alcol al 70%, fino a completa eliminazione della colorazione gialla dovuta alla soluzione di Bouin che avrebbe interferito con le successive fasi di colorazione e rilevazione delle caratteristiche morfometriche dei campioni. Nel caso specifico i parassiti sono stati sottoposti a risciacqui giornalieri per circa 2 mesi (in funzione delle loro dimensioni) e poi conservati in alcol 70% fino alla successiva fase di colorazione.

Colorazione

Per la colorazione è stato utilizzato il carminio boracico di Grenacher (soluzione acquosa di borace al 4% e carminio). Le fasciole precedentemente fissate, lavate e conservate in alcol al 70% sono state immerse in una provetta contenente il carminio boracico. Il tempo di permanenza all'interno del colorante è stato proporzionale allo spessore e dimensioni del parassita considerando che queste caratteristiche influenzano la capacità del colorante di penetrare nei tessuti. I parassiti devono colorarsi non eccessivamente per facilitare la fase successiva di diafanizzazione. Le fasciole oggetto della presente indagine sono rimaste immerse nel colorante per un periodo compreso tra le 12 e le 24

Elisabetta Pintore

"*Fasciola hepatica* in Sardegna: caratterizzazione fenotipica, valutazione dell'andamento climatico sulla stagionalità, trasmissione e diffusione della parassitosi"

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Sassari

ore. Il grado di colorazione è stato valutato osservando a cadenza regolare i parassiti allo stereomicroscopio.

Diafanizzazione

Terminata la colorazione, ciascun esemplare è stato posto su piastra di Petri con etanolo al 70%. Tramite l'ausilio dello stereomicroscopio, si è proceduto alla fase di diafanizzazione del parassita mediante aggiunta goccia a goccia di acido cloridrico commerciale (35%) fino alla chiara visualizzazione in trasparenza di tutti gli organi interni. La durata ed il quantitativo di acido cloridrico utilizzati sono stati proporzionali alle dimensioni e allo spessore del trematode (Panova, 2002).

Disidratazione

Dopo la differenziazione si è passati alla disidratazione in una serie di piastre di Petri ciascuna contenente alcoli a percentuali crescenti. L'operazione è stata effettuata sempre singolarmente per ciascun parassita e ha seguito i seguenti passaggi:

- etanolo al 70% per 10 minuti;
- etanolo al 96% per 15 minuti;
- etanolo assoluto per 15 minuti;
- alcol butilico per 15 minuti
- xilolo per 15 minuti.

Montaggio

La completa disidratazione si è resa necessaria per il corretto montaggio non essendo il balsamo del Canada idrosolubile. Su di un vetrino portaoggetto è stata collocata una goccia di balsamo sopra la quale è stato posto delicatamente il trematode disidratato con la ventosa ventrale rivolta verso l'alto. Con un pennellino bagnato in xilolo si è provveduto a ricoprire uniformemente il parassita di balsamo evitando la formazione di bolle d'aria. Il vetrino dopo essere stato montato è stato posto in stufa a 20°C per un periodo variabile fra 4 e 24 ore (Marcos, 1993).

Elisabetta Pintore

"Fasciola hepatica in Sardegna: caratterizzazione fenotipica, valutazione dell'andamento climatico sulla stagionalità, trasmissione e diffusione della parassitosi"

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Sassari

Tecniche di misurazione: studio morfometrico CIAS

Per l'acquisizione delle immagini è stata utilizzata una fotocamera digitale Nikon Coolpix 5400 e per quelle delle ventose e faringe ci si è serviti di un microscopio Nikon modello SE equipaggiato con un revolver di 4 obiettivi (4X 10X 40X 100X) collegato con una videocamera a colori 3CCD (Sony DXC-930P).

Per l'elaborazione delle immagini e per il calcolo delle misurazioni è stato utilizzato il programma Image-Pro Plus version 5.1. per Windows (Media Cybernetics Inc., Silver Spring, USA). Con tale programma è stato possibile ottenere anche ingrandimenti macro sulle immagini digitalizzate per il calcolo dei parametri morfometrici desiderati.

Tutte le misurazioni sono state esportate su foglio di calcolo Excel (Microsoft Office, 2017).

Solamente le fasciole adulte sono state selezionate per lo studio morfologico e morfometrico secondo la metodologia CIAS (Computer Image Analysis System) (Valero et al.1996-2005; Periago et al. 2016,2008).

I parametri utilizzati misurati ed analizzati nelle fasciole adulte sono stati i seguenti (Valero et al.1996-2005; Periago et al. 2016,2008):

Caratteri lineari biometrici:

BL= body length;

BW =maximum body width;

BW_{ov} = body width at ovary level;

BP= body perimeter;

BR=Body roundness ($BR=BP^2/4\pi BA$);

CL= cone length;

CW= cone width;

OS_{max} =maximum diameter of oral sucker;

OS_{min}= minimum diameter of oral sucker;

VS_{max}=maximum diameter of ventral sucker;

VS_{min} = minimum diameter of ventral sucker;

A-VS = distance between the anterior end of the body and the ventral sucker;

OS-VS= distance between the oral sucker and the ventral sucker;

Elisabetta Pintore

"*Fasciola hepatica* in Sardegna: caratterizzazione fenotipica, valutazione dell'andamento climatico sulla stagionalità, trasmissione e diffusione della parassitosi"

VS-Vit=distance between the ventral sucker and the union of the vitelline glands;

Vit-P =distance between the union of the vitelline glands and the posterior end of the body;

VS-P =distance between the ventral sucker and the posterior end of the body;

PhL= pharynx length;

PhW= pharynx width;

TL=testicular length;

TW= testicular width;

TP= testicular perimeter;

Superfici

BA= body area;

OSA=oral sucker area);

VSA= ventral sucker area;

PhA= pharynx area ;

TA =testicle area (taking both testes together,);

Rapporti:

BL/BW= body length over body width;

BWOv/CW= body width at ovary level over cone width;

OSA/VSA=oral sucker area over ventral sucker area;

BL/VS-P= body length over the distance between the ventral sucker and the posterior end of the body.

La misurazione del **body roundness** ($BR=BP^2/4\pi BA$) è stata utilizzata per quantificare la forma del corpo del parassita. Misura quanto sia circolare un corpo (un corpo perfettamente rotondo avrà una BR di 1 mentre più il corpo appare irregolare più si discosterà da tale valore (Periago et al., 2006).

Elisabetta Pintore

“*Fasciola hepatica* in Sardegna: caratterizzazione fenotipica, valutazione dell’andamento climatico sulla stagionalità, trasmissione e diffusione della parassitosi”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Sassari

Metodi statistici:

Analisi delle componenti principali (ACP)

L'analisi delle componenti principali (ACP) è una tecnica di analisi statistica multivariata utilizzata per la semplificazione dei dati e gioca anche un ruolo ausiliario rispetto all'analisi fattoriale (CDA). Lo scopo di tale tecnica è quello di ridurre il numero più o meno elevato di variabili che descrivono un insieme di dati a un numero minore di variabili latenti, limitando il più possibile la perdita di informazioni. Ciò avviene tramite una trasformazione lineare delle variabili che proietta quelle originarie in un nuovo sistema cartesiano in cui la nuova variabile con la maggiore varianza Componente principale 1 (CP1) viene proiettata sul primo asse, quella seconda per dimensione della varianza Componente principale 2 (CP2), sul secondo asse e così via (<https://it.wikipedia.org/wiki?cv=1&curid=49731>). La prima componente principale spiega da sola la maggior parte della varianza totale mentre i contributi delle altre componenti principali sono nettamente inferiori. Le componenti principali forniscono quindi una spiegazione alternativa della variabilità osservata con il pregio di descrivere il fenomeno oggetto di studio mediante dimensioni fra loro non correlate e ordinate in termini della loro importanza nella spiegazione. Questo permette di ridurre il numero di variabili da considerare, e di interpretare il fenomeno oggetto di studio, interpretando le componenti principali non scartate (Dujardin et al. 2002 ;<http://www-dimat.unipv.it/luca/words/PCAprint.pdf>.; <https://docplayer.it/409899-Principal-component-analysis-pca.html>). L'ACP permette di esplorare le variazioni individuali tra i soggetti esaminati e di poterli raggruppare quindi in una mappa dove ogni gruppo è rappresentato da un tracciato (plot) generato sulla base delle prime due componenti principali (Bookstain, 1989; Rohlf & Marcus, 1993; Dujardin, 2002; Dujardin & Pont, 2004;). Per realizzare l'analisi in maniera ottimale i dati iniziali vengono trasformati in logaritmi naturali per premettere una migliore analisi statistica (normalizzazione della distribuzione, agguagliamento della varianza ecc...).

Questa analisi è stata effettuata utilizzando il software BAC v.2 (Dujardin, 2002), modulo del pacchetto CLIC (di J.P. Dujardin, <http://momedujardin.wordpress.com>). Per il calcolo della correlazione tra le due variabili è stata utilizzata la correlazione di Pearson e sono stati considerati statisticamente significativi i risultati con $p < 0,05$.

Elisabetta Pintore

"Fasciola hepatica in Sardegna: caratterizzazione fenotipica, valutazione dell'andamento climatico sulla stagionalità, trasmissione e diffusione della parassitosi"

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Sassari

Analisi dei fattori canonici

L'analisi dei fattori canonici discriminante CDA (Canonical Discriminant Analysis) o analisi fattoriale è un'analisi multivariata utilizzata nello studio della localizzazione geografica, della differenziazione delle specie e della macroevoluzione (Reis, et al., 1990). È un'estensione dell'analisi delle componenti principali e trova applicazione quando si tratta di discriminare la varianza tra gruppi (e non tra soggetti) noti a priori. L'applicazione del CDA per studiare organismi la cui distribuzione delle dimensioni è troppo ampia può causare notevoli errori. L'analisi delle componenti principali (ACP) precedentemente descritta permette quindi di poter sintetizzare la maggior parte delle variazioni dimensionali in un insieme di dati multivariati rappresentati dalla Componente 1 (Dujardin & Le Pont, 2004) riducendo quindi l'errore, in questo caso specifico eliminando "l'effetto dimensione" ovvero le differenze di dimensioni all'interno delle popolazioni comparate (Dujardin et al., 2002) ai fini di ottenere una corretta analisi discriminatoria canonica. La CDA permette di indagare o verificare se la struttura teorica di un test corrisponde a quella empiricamente raggiunta. (da <http://wwwdata.unibg.it/dati/corsi/64023/38353-Analisi%20fattoriale.pdf>). La prima combinazione lineare sarà la funzione: F1 che rende massima la varianza tra le classi e, quindi, minima la varianza entro le classi; la seconda funzione lineare discriminante F2 sarà quella che, non correlata con la prima, renderà massima la varianza tra le classi, e così via. La CDA minimizza quindi le distanze di varianza tra punti di uno stesso gruppo e massimizza, invece, quelle tra individui di gruppi diversi utilizzando la distanza di Mahalanobis. (Mahalanobis, 1936). In statistica, la distanza di Mahalanobis è una misura di distanza basata sulle correlazioni tra variabili attraverso le quali differenti pattern possono essere identificati ed analizzati. Si tratta di un'utile metodo di calcolo per determinare la *similarità* di uno spazio campionario incognito rispetto ad uno noto. La distanza di Mahalanobis permette di misurare distanze su campioni di cui non si conoscono le unità di misura, assegnando di fatto un fattore di scala automatico ai dati. (https://it.wikipedia.org/wiki/Distanza_di_Mahalanobis).

Nella presente ricerca i gruppi sono stati creati sulla base dell'area geografica di appartenenza dei campioni e tale classificazione a priori è stata confrontata con quella ottenuta sulla base dei valori assunti dalle variabili esplicative (Fattore 1 e Fattore 2) valutando se in questo caso, le variabili

Elisabetta Pintore

"*Fasciola hepatica* in Sardegna: caratterizzazione fenotipica, valutazione dell'andamento climatico sulla stagionalità, trasmissione e diffusione della parassitosi"

morfologiche hanno capacità discriminante rispetto alla zona geografica e che rappresenta la variabile qualitativa “da spiegare” rispetto alla quale le unità sono raggruppate.

Questa analisi è stata effettuata utilizzando il software PAD v.2 (Dujardin, 2002), modulo del pacchetto CLIC (di J.P. Dujardin, <http://momedujardin.wordpress.com>). Per il calcolo della correlazione tra le due variabili si è utilizzato la correlazione di Pearson e sono stati considerati statisticamente significativi i risultati con $p > 0,05$.

Meteorologia

Grazie ai dati forniti dall' Aeronautica militare (Comando Squadra Aerea, Stato Maggiore- Reparto per la meteorologia) è stato possibile analizzare i dati meteorologici giornalieri dal gennaio 1988 al dicembre 2017 rilevati da 10 stazioni meteo della Sardegna. Su dieci di esse sette sono state valutate come le più rappresentative in base alla loro localizzazione geografica: Alghero, Capo Bellavista, Capo Carbonara, Capo Frasca, Decimomannu, Olbia e Perdasdefogu (Fig. 2). Per ciascuna sono stati presi in esame i seguenti parametri: Temperatura Massima (°C); Temperatura minima (°C); Temperatura Media (°C); Giorni di pioggia (n.); Totale pioggia caduta mensilmente (mm); Umidità relativa (mm); Evapotraspirazione (mm). L'Evapotraspirazione media mensile è stata calcolata secondo la formula di Hargreaves modificata tenendo in considerazione la Radiazione solare extraterrestre, la temperatura massima minima e media mensile. (Hargreaves & Samani, 1985; Samani, 2000). Dai dati giornalieri sono state ottenute le medie mensili per ciascun mese degli ultimi 30 anni. È stata effettuata la media per ciascun parametro di ogni mese al fine di ottenere un valore medio rappresentativo del trentennio. Le variabili meteorologiche ottenute da ogni stazione sono rappresentate nella tabella 2.

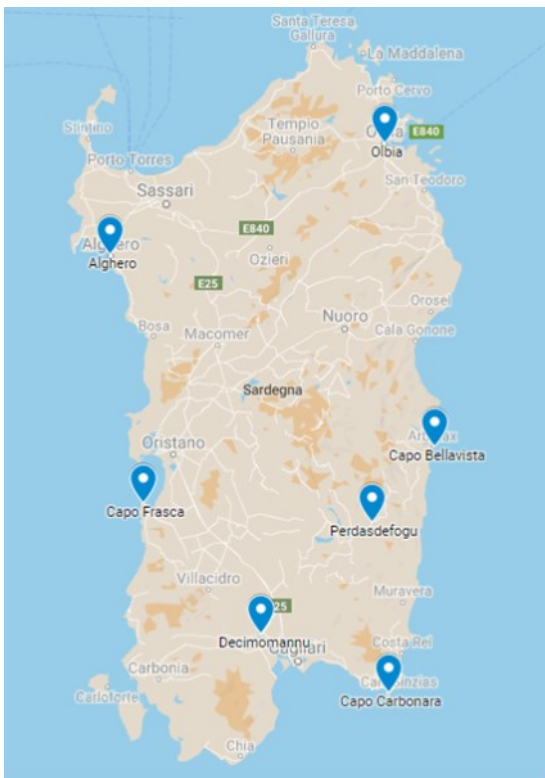


Fig 2 Stazioni meteorologiche

Elisabetta Pintore

"Fasciola hepatica in Sardegna: caratterizzazione fenotipica, valutazione dell'andamento climatico sulla stagionalità, trasmissione e diffusione della parassitosi"

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Sassari

Alghero							Capo Bellavista						Capo Carbonara					
Mese	Min T m	Max T m	Media T	Precipit m	Evapotras	Umidità rel	Min T m	Max T m	Media T	Precipit m	Evapotras	Umidità rel	Min T m	Max T m	Media T	Precipit m	Evapotras	Umidità rel
Gennaio	4,48	13,90	9,42	41,73	1,13	80,70	7,20	13,48	10,34	41,76	1,01	71,68	9,20	14,32	12,03	23,29	3,39	76,02
Febbraio	4,25	13,51	9,10	52,31	1,49	79,44	6,99	13,85	10,42	23,11	1,41	69,06	8,81	14,35	11,38	24,40	3,71	75,43
Marzo	5,75	15,26	11,38	35,28	2,17	78,67	8,59	16,02	12,30	28,99	2,12	70,05	9,99	15,94	15,88	23,53	1,95	75,23
Aprile	7,94	18,35	14,78	48,12	3,24	76,81	10,56	18,44	14,50	35,19	2,95	70,23	11,45	18,08	18,51	29,03	4,95	73,40
Maggio	10,50	22,47	16,41	47,35	4,38	74,54	13,82	22,23	18,03	18,92	3,87	69,42	13,91	22,37	18,14	17,09	3,89	69,25
Giugno	14,38	26,84	20,35	17,18	5,25	70,46	17,84	27,04	22,44	7,20	4,79	68,36	17,84	27,04	22,44	7,20	4,79	68,02
Luglio	17,28	29,90	22,79	11,58	5,58	68,27	20,99	30,05	22,44	5,81	4,92	68,08	20,91	30,04	25,47	5,81	4,92	68,08
Agosto	17,10	30,29	22,75	7,04	4,99	69,38	20,73	30,32	22,44	11,66	4,55	68,55	21,40	30,32	25,86	11,66	4,55	68,31
Settembre	14,74	26,39	21,68	38,84	3,67	73,26	17,26	25,52	22,44	40,60	2,88	70,18	18,19	25,91	22,05	38,14	3,23	68,16
Ottobre	11,51	22,02	16,17	73,35	2,24	78,13	15,25	22,98	22,44	50,85	2,15	71,70	15,25	22,90	19,08	50,95	2,13	71,30
Novembre	8,12	17,84	12,98	73,10	1,47	78,55	11,22	17,51	22,44	64,61	1,24	70,22	11,22	17,51	14,36	64,61	1,24	70,22
Dicembre	5,75	14,88	11,05	84,23	1,06	80,07	8,10	14,68	22,44	54,22	0,91	68,49	8,10	14,68	11,15	54,22	0,91	68,49
Capo Frasca							Decimomannu						Olbia					
Mese	Min T m	Max T m	Media T	Precipit m	Evapotras	Umidità rel	Min T m	Max T m	Media T	Precipit m	Evapotras	Umidità rel	Min T m	Max T m	Media T	Precipit m	Evapotras	Umidità rel
Gennaio	7,23	12,66	9,95	53,61	6,80	84,28	4,28	14,01	9,14	49,11	4,05	79,77	4,23	13,61	8,92	43,21	1,18	76,90
Febbraio	6,99	12,76	9,87	49,40	4,10	81,10	4,24	14,59	9,42	48,65	4,27	76,41	4,51	13,48	9,00	35,27	1,49	73,94
Marzo	8,40	14,82	11,61	31,07	1,93	82,29	5,75	16,97	11,36	44,48	5,04	72,86	5,73	16,54	11,13	42,68	2,31	72,78
Aprile	10,51	17,19	13,85	47,37	11,33	81,42	8,01	19,89	13,95	88,83	5,54	69,00	7,37	17,61	12,49	38,15	3,16	71,61
Maggio	13,69	21,04	17,36	28,37	4,41	79,07	11,57	24,52	18,03	25,22	6,73	63,42	10,42	22,72	16,57	21,25	4,47	68,08
Giugno	17,51	31,67	24,59	13,75	14,94	79,02	15,44	29,11	21,41	14,40	7,20	57,85	14,53	27,18	20,75	12,60	7,58	62,58
Luglio	19,64	27,26	23,45	3,22	8,74	80,36	18,56	32,23	24,54	4,05	7,67	56,45	17,75	30,92	24,33	6,10	5,77	60,20
Agosto	20,55	28,43	24,49	5,11	11,35	80,02	19,28	32,91	25,24	12,45	7,38	60,06	17,42	31,22	24,32	17,06	5,31	62,63
Settembre	18,12	25,23	21,68	38,70	2,92	79,60	16,30	28,31	22,30	31,84	3,87	68,72	13,98	26,63	20,31	42,30	3,89	70,92
Ottobre	15,27	22,34	18,80	58,51	4,83	82,96	13,11	23,33	20,28	54,58	7,59	75,19	10,06	21,41	15,74	76,82	2,37	76,25
Novembre	11,28	17,31	14,30	78,68	1,19	83,86	8,64	18,18	13,41	97,61	4,19	78,01	6,96	16,62	11,79	62,38	1,36	77,51
Dicembre	8,18	13,38	10,78	62,99	0,92	84,59	5,20	14,32	9,77	90,67	3,79	78,77	4,95	14,13	9,54	46,83	1,03	75,63
Perdasdefogu																		
Mese	Min T m	Max T m	Media T	Precipit m	Evapotras	Umidità rel												
Gennaio	3,89	9,69	6,79	71,98	0,81	79,70												
Febbraio	3,61	10,21	6,91	52,50	1,21	69,70												
Marzo	7,68	11,86	8,56	46,46	1,69	66,79												
Aprile	6,43	15,69	10,06	36,51	2,51	67,31												
Maggio	10,11	19,89	14,06	26,62	3,54	64,36												
Giugno	14,02	24,43	18,81	17,28	4,59	52,05												
Luglio	17,22	28,33	22,37	15,24	5,06	47,47												
Agosto	17,57	28,44	22,60	16,28	4,50	56,34												
Settembre	14,67	24,06	18,96	41,16	3,15	66,34												
Ottobre	11,87	19,70	15,59	41,65	1,98	73,45												
Novembre	8,37	14,87	11,42	81,52	1,10	76,85												
Dicembre	5,20	10,91	7,85	67,56	0,75	78,41												

Tabella 2. Medie mensili del trentennio 1988-2017 dei parametri valutati per lo studio climatico per ciascuna stazione meteorologica.

I dati meteorologici sono stati fondamentali al fine di ottenere:

- valutazione della omogeneità o eterogeneità dell'Isola da un punto di vista climatico;
- valutazione della stagionalità nella trasmissione della parassitosi;
- valutazione dell'impatto del clima.

Elisabetta Pintore

"Fasciola hepatica in Sardegna: caratterizzazione fenotipica, valutazione dell'andamento climatico sulla stagionalità, trasmissione e diffusione della parassitosi"

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Sassari

Omogeneità o eterogeneità climatica della Sardegna

La Sardegna è eterogenea o omogenea dal punto di vista climatico?

Per rispondere a questa domanda sono stati presi in esame tutti i dati meteo mensili ottenuti dal 1988 al 2017. Per ogni stazione meteorologica e per ciascun parametro, sono state calcolate le medie mensili e da queste per ogni stazione si è ottenuto un anno rappresentativo del trentennio 1988-2017 costituito da dodici mesi ciascuno dei quali è il risultato della media di tutti gli stessi mesi nel corso dei trent'anni. Per chiarire meglio, ad esempio, il mese di gennaio ottenuto, non è altro che la media dei trenta mesi di gennaio dal 1988 al 2017.

È stato quindi creato un grafico, un climadiagramma, nel quale è stato rappresentato il trend di ciascun parametro medio mensile nel corso dei trent'anni.

I trend dei climadiagrammi, ottenuti per ciascuna stazione meteo sono stati comparati fra di loro (mediante analisi descrittiva dei dati) per stabilire se ci fosse o meno omogeneità tra le diverse aree dell'isola.

Stagionalità nella trasmissione della distomatosi.

Esiste una stagionalità nella trasmissione della fasciolosi o può essere trasmessa durante tutto l'anno? Come noto, la trasmissione di *Fasciola spp.* è strettamente correlata al ciclo vitale del suo ospite intermedio *Lymnaea*. Questi gasteropodi acquatici hanno bisogno di particolari condizioni di umidità, temperatura e precipitazioni per potersi riprodurre. Situazioni climatiche sfavorevoli possono provocarne interrimento e la sospensione del ciclo vitale o addirittura la morte. (Arru & Papadopoulos, 1971; Mas-Coma et al., 1999; 2009).

Per la valutazione della stagionalità in aree in cui l'altitudine non ha particolare rilevanza, si utilizza un indice di previsione climatica noto come MT o Wet Day Index. Fu proposto per la prima volta nel 1959 (Ollerenshaw, 1959) e successivamente ripreso e modificato dallo stesso autore (Ollerenshaw, 1971, 1973, 1974).

Elisabetta Pintore

"*Fasciola hepatica* in Sardegna: caratterizzazione fenotipica, valutazione dell'andamento climatico sulla stagionalità, trasmissione e diffusione della parassitosi"

Viene espresso dalla seguente equazione:

$$MT = n (R - P + 125) / 25 \quad (1)$$

Dove

n rappresenta il numero dei giorni di pioggia;

R la pioggia caduta in mm;

P l'evapotraspirazione media in mm.

La valutazione dell'MT mensile nel corso degli anni permette di stabilire un valore soglia al di sotto del quale non è possibile la trasmissione di *F. hepatica*. I mesi con valori uguali o al di sopra di tale valore soglia sono considerati ad alto rischio per l'incidenza della patologia. Ad esempio tale valore è stato stabilito essere pari a 100 per il Regno Unito ed a 80 per la Francia (Ollerenshaw, 1971) (Ollerenshaw, 1973). Questo studio ha permesso di stabilire il valore soglia di MT per la Sardegna. L'MT è stato calcolato per ogni mese di ogni anno per ogni stazione meteorologica ottenendo due *data set*:

- Medie mensili dal 1988 al 2017;
- Medie annuali dal 1988 al 2107.

La stagionalità della trasmissione è stata quindi stabilita attraverso lo studio delle curve dell'andamento annuale dell'MT medio mensile misurato per ciascuna delle 7 stazioni.

Analisi dell'Impatto del cambiamento climatico

Per l'analisi dell'impatto del cambiamento climatico sulla trasmissione della fasciolosi è stato studiato invece l'MT medio annuo ed il suo andamento nel corso del trentennio 1988-2017 per ogni stazione meteorologica. Le curve, aggiustate in base alla stagionalità, considerando quindi i mesi durante i quali si verifica l'effettiva trasmissione della parassitosi, sono state analizzate attraverso un modello di regressione lineare. I dati ottenuti sono stati giudicati statisticamente significativi con valori di $p < 0,05$.

Elisabetta Pintore

"*Fasciola hepatica* in Sardegna: caratterizzazione fenotipica, valutazione dell'andamento climatico sulla stagionalità, trasmissione e diffusione della parassitosi"

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Sassari

Di tutte le misurazioni effettuate sono state comparate solamente quelle che dai precedenti studi sono state valutate come non ridondanti (Periago et al., 2016; Valero et al. 1996-2005) e precisamente **BL**, **BW**, **BP**, **OSmax**, **OSmin**, **VSmax**, **VSmin**, **A-VS**, **Vs-Vit**, **Vit-P**, **PhL**, **PhW**, **TL**. Le misurazioni effettuate sui campioni della Sardegna sono state comparate con quelle già note di *F. hepatica* campionate nell'area di Valencia (Spagna), della Polonia, Bolivia, Perù ed Egitto, e con *F. gigantica* dell'Egitto (Tab.4).

	Sardegna F.h.	Valencia F.h.	Bolivia F.h.	Egitto F.h.	Peru F.h.	Egitto F.g.
BL	34,33-13,89 22,60 +/- 4,55	31,17-14,21 20,81 +/- 3,87	31,04-9,64 18,07+/-4,43	37,43-28,07 32,95 +/- 3,33	30,97-13,40 19,08+/-3,38	54,93-40,09 48,39 +/- 3,36
BW	13,26-6,15 9,69 +/- 1,52	12,76- 7,49 9,74+/- 1,12	13,41-4,23 8,24 +/- 1,95	12,92-10,53 11,46 +/- 0,73	14,23-5,05 10,41+/- 1,58	12,45-8,73 10,63 +/- 0,90
BP	79,25-34,72 55,15 +/- 10,17	71,41-39,85 52,9 +/- 8,10	68,35- 26,89 47,45 +/- 10,20	81,40- 62,81 72,95 +/- 6,41	71,10-30,20 46,35+/-7,36	114,17-57,62 101,88 +/- 10,32
OS max	1,12-0,31 0,85 +/- 0,11	1,00-0,63 ,83 +/- 0,06	1,06-0,53 0,75 +/- 0,08	1,02-0,84 0,91 +/- 0,06	1,14-0,60 0,83+/-0,07	1,12-0,55 1,01 +/- 0,09
OS min	0,94-0,43 ,064 +/- 0,10	0,86-0,51 0,66 +/- 0,08	0,85-0,41 0,63 +/-0,08	0,82-0,62 0,73 +/- 0,05	0,89-0,29 0,65+/-0,101	0,97-0,44 0,82 +/- 0,09
VS max	1,92-0,77 1,24 +/- 0,20	1,40- 0,916 1,19+/- 0,09	1,24-0,74 1,00 +/- 0,11	1,36-1,06 1,20 +/- 0,09	1,31-0,83 1,11+/-0,08	1,82-1,11 1,56 +/- 0,13
VS min	1,57-0,71 1,08 +/- 0,17	1,483-0,68 1,06 +/- 0,15	1,28-0,63 0,98 +/- 0,10	1,22-0,955 1,08+/-0,08	1,21-0,72 0,98+/-0,08	1,64-0,94 1,41 +/- 0,14
A-VS	3,62-1,69 2,32+/- 0,40	3,15-1,66 2,31 +/- 0,33	3,35-1,51 2,24 +/- 0,30	3,52-2,82 3,04+/- 0,21	3,26-1,61 2,42+/-0,27	3,87-2,61 3,32 +/- 0,31
VS-Vit	24,85-4,88 12,89 +/- 3,24	22,96-9,64 13,84 +/- 2,85	19,82-4,48 11,30 +/- 3,17	25,61-17,69 21,83 +/- 2,75	20,59-6,78 11,75 +/- 2,31	38,17-21,57 30,45 +/- 3,76
Vit-P	12,63- 3,52 6,49 +/- 1,82	6,88-1,11 3,45 +/- 1,21	9,83-0,48 3,75 +/- 1,95	10,14-7,04 8,38 +/-1,17	9,47-2,64 4,98 +/- 1,37	21,37-9,81 14,82 +/- 2,49
PhL	0,94-0,49 0,71 +/- 0,11	0,88- 0,58 0,73 +/- 0,078	0,92-0,37 0,67 +/- 0,10	0,92-0,64 0,78+/-0,09	0,95-0,55 0,76 +/- 0,07	1,04-0,48 0,85 +/- 0,11
PhW	0,65-0,26 0,45 +/- 0,08	0,51- 0,29 0,39 +/- 0,054	0,50-0,17 0,33+/-0,05	0,48-0,27 0,37+/-0,06	0,54-0,24 0,35 +/- 0,05	0,60-0,26 0,43 +/- 0,070
TL	21,85-6,42 11,81 +/- 3	14,53-6,02 9,38 +/- 1,95	14,61-3,11 8,12+/- 2,46	18,32-11,09 14,97+/-2,24	15,61-4,53 8,77+/- 1,78	27,60-15,45 22,09 +/- 3,51

Tabella 4: Valori massimi e minimi, media deviazione standard di *F. hepatica* campionate in Sardegna, Valencia, Bolivia, Perù, Egitto Polonia, e di *F. gigantica* (Egitto). **BL** = body length; **BW** = maximum body width; **BP** = body perimeter; **OSmax** = maximum diameter of oral sucker; **OSmin** = minimum diameter of oral sucker; **VSmax** = maximum diameter of ventral sucker; **VSmin** = minimum diameter of ventral sucker; **A-VS** = distance between the anterior end of the body and the ventral sucker; **VS-Vit** = distance between the ventral sucker and the union of the vitelline glands; **Vit-P** = distance between the union of the vitelline glands and the posterior end of the body; **PhL** = pharynx length; **PhW** = pharynx width; **TL** = testicular length;

Elisabetta Pintore

"*Fasciola hepatica* in Sardegna: caratterizzazione fenotipica, valutazione dell'andamento climatico sulla stagionalità, trasmissione e diffusione della parassitosi"

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Sassari

Le fasciole campionate in Sardegna sono state comparate con popolazioni standard mediante un'analisi multivariata in base allo studio dei componenti principali (ACP). Nel grafico n. 1 sono rappresentate le popolazioni sottoforma di perimetri ottenuti da un grafico a dispersione basato sulle prime due componenti principali indicative delle variabili di dimensioni (asse delle x) e forma (asse delle y). La componente principale 1 (CP1) ha il massimo effetto sulle dimensioni dei campioni rappresentati incidendo in questo caso per il 73%. L'esame del grafico dimostra come il "gruppo Sardegna non si sovrappone al gruppo *F. gigantea* (Egitto) mentre evidenzia come le fasciole della Sardegna abbiano dimensioni comuni ai gruppi *F. hepatica* standard.

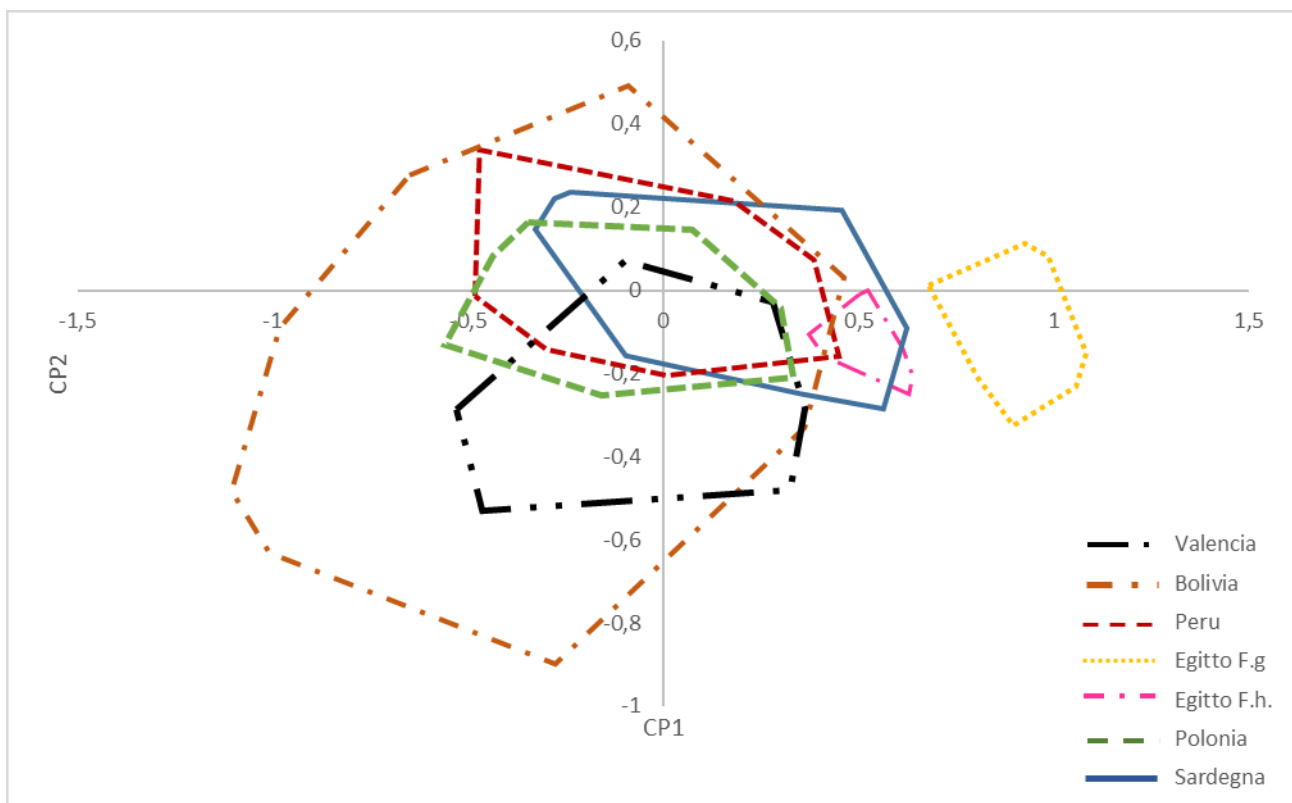


Grafico 1: Mappa delle componenti principali (ACP) riportante le diverse popolazioni di fasciole adulte repertate in ovini della Sardegna e popolazioni di *F. hepatica* precedentemente studiate e provenienti da Valencia (Spagna), Polonia, Bolivia, Perù *F. hepatica* e *F. gigantea* dell' Egitto (Periago et al., 2006). I campioni sono rappresentati in base ai loro componenti principali (PC1, 73% e PC2, 9%). Ciascun perimetro rappresenta un gruppo distinto.

Elisabetta Pintore

"*Fasciola hepatica* in Sardegna: caratterizzazione fenotipica, valutazione dell'andamento climatico sulla stagionalità, trasmissione e diffusione della parassitosi"

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Sassari

37

Nel grafico 2, generato in base all'analisi dei fattori canonici discriminanti (CDA), sono rappresentate le popolazioni come perimetri ottenuti da un grafico a dispersione basato sui primi due fattori canonici che discriminano la varianza tra gruppi della Sardegna con popolazioni standard di *F. hepatica* provenienti da Spagna, Polonia, Egitto Bolivia, Perù e *F. gigantea* dell'Egitto (Periago et al., 2006). Viene definito "size out" perché l'effetto delle variazioni in base alle dimensioni viene rimosso. L'esame del grafico mostra come le massime distanze siano presenti fra le popolazioni *F. hepatica* dei diversi paesi e quella di *F. gigantea* dell'Egitto.

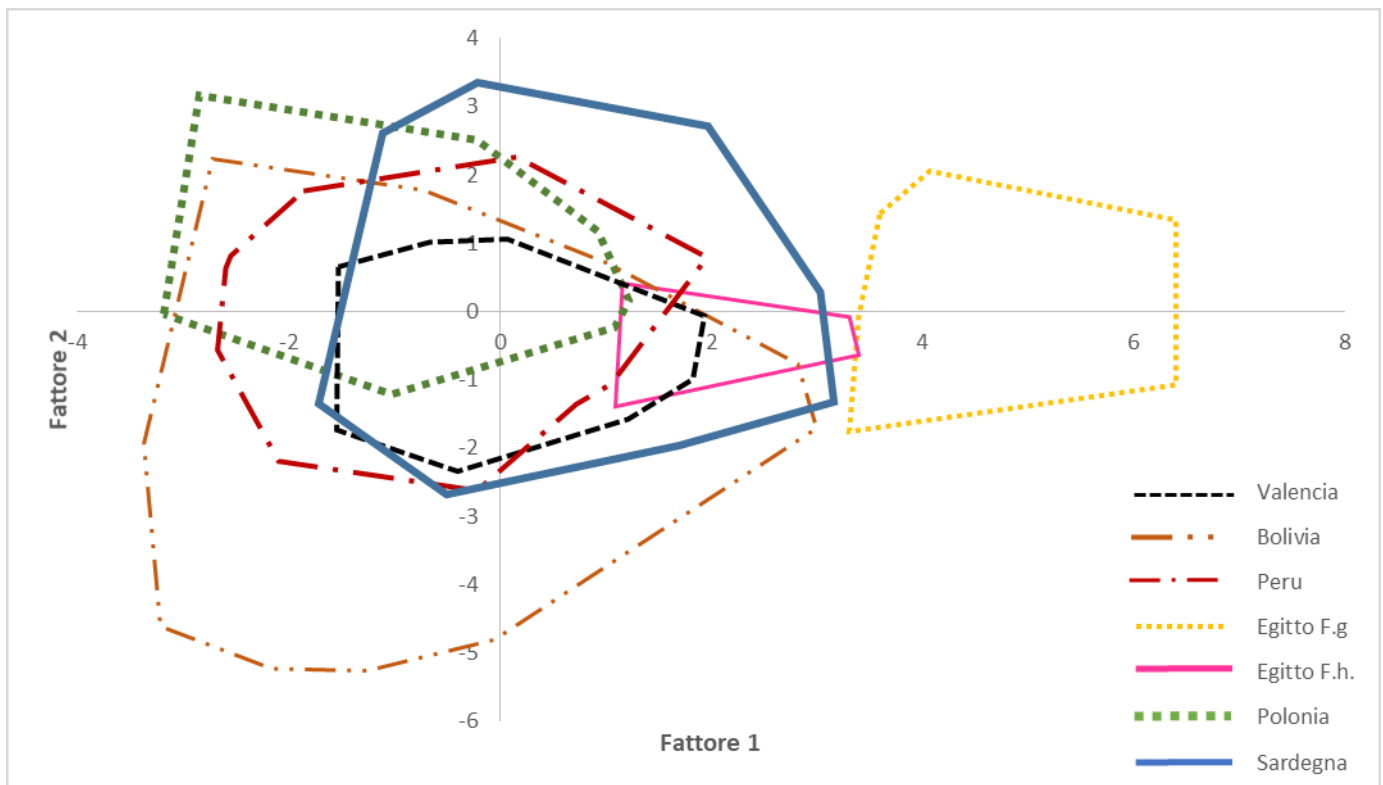


Grafico 2: Grafico Size-out indipendente dall'effetto dalle dimensioni corrispondente a fasciole adulte repertate in ovini della Sardegna con popolazioni standard di *F. hepatica* già descritte e provenienti da Spagna, Polonia, Egitto Bolivia, Perù e *F. gigantea* dell'Egitto (Periago et al., 2006). I campioni sono rappresentati in base ai loro componenti principali (PC1, 73% e PC2, 9%). Ciascun perimetro rappresenta un gruppo.

Elisabetta Pintore

"*Fasciola hepatica* in Sardegna: caratterizzazione fenotipica, valutazione dell'andamento climatico sulla stagionalità, trasmissione e diffusione della parassitosi"

Le distanze di Mahalanobis rappresentate nella tabella 5, confermano i risultati rappresentati nel grafico 2.

Mahalanobis	Valencia	Bolivia	Peru	Egitto F.h	Polonia	Sardegna	Egitto F.g.
Valencia	0.00						
Bolivia	1.75	0.00					
Peru	1.98	1.88	0.00				
Egitto F.h	3.14	3.14	3.08	0.00			
Polonia	1.97	2.49	1.56	3.75	0.00		
Sardegna	2.29	2.58	2.29	2.92	2.51	0.00	
Egitto F.g.	5.41	5.57	5.66	3.18	5.94	4.63	0.00

Tabella 5: Distanze di Mahalanobis.

Fenotipizzazione di *F. hepatica* nei Bovini

Nella tabella 6 sono riassunti i dati relativi alle misurazioni effettuate esclusivamente sugli esemplari adulti di *F. hepatica* reperiti in bovini in Sardegna (Valero et al., 1996-2005; Periago et al., 2016; 2008). Di tutte le misurazioni effettuate sono state comparate solamente quelle che dai precedenti studi sono state valutate come non ridondanti (Periago et al., 2016):

BL, BW, BL/BV, PL, PW, PL/PW, Vs-Vit, Vit-P.

Codice	Specie	BL	BW	BL/BW	PL	PW	PL/PW	VS-Vit	Vit-P
6B1	Bovino	21,96	8,84	2,49	0,64	0,42	1,52	11,29	9,08
6B2	Bovino	22,35	6,76	3,31	0,78	0,57	1,36	13,60	6,11
6B3	Bovino	21,71	8,48	2,56	0,73	0,41	1,77	13,21	6,00
6B4	Bovino	19,22	7,60	2,53	0,78	0,66	1,18	12,47	4,68
8B1	Bovino	20,57	9,80	2,10	0,55	0,36	1,50	14,24	5,01
8B2	Bovino	18,97	7,65	2,48	0,61	0,52	1,18	10,04	7,01
9B1	Bovino	23,51	9,94	2,37	0,68	0,40	1,71	15,44	6,10
9B2	Bovino	24,04	9,87	2,44	0,62	0,40	1,54	16,05	6,19
9B3	Bovino	20,42	9,49	2,15	0,62	0,40	1,55	13,06	5,67
9B4	Bovino	19,38	9,97	1,94	0,58	0,31	1,88	12,39	5,48
9B5	Bovino	20,29	9,44	2,15	0,58	0,40	1,44	13,24	5,60
9B6	Bovino	20,20	9,56	2,11	0,46	0,32	1,42	14,02	4,18

Tabella 6. Dati morfometrici misurati sulle fasciole adulte campionate dai bovini in Sardegna.

Elisabetta Pintore

“*Fasciola hepatica* in Sardegna: caratterizzazione fenotipica, valutazione dell’andamento climatico sulla stagionalità, trasmissione e diffusione della parassitosi”

Le misurazioni effettuate sui campioni provenienti dalla Sardegna sono state comparate con quelle già note di *F. hepatica* campionate in Corsica, *F. hepatica* campionate nell'area di Valencia, *F. hepatica* in Galicia, e *F. gigantica* in Burkina Faso come riportato nella Tabella n. 7.

	<i>Corsica F.h.</i>	<i>Valencia F.h.</i>	<i>Galicia F.h.</i>	<i>Sardegna F.h.</i>	<i>Burkina Faso F.g.</i>
BL	28,9-12,2 20,94 +/- 3,42	22,92-11,64 17,5 +/- 2,07	21,94-12,36 16,53+/- 2,05	24,04-18,97 21,05+/-1,66	52,29-28,82 40,01+/-5,19
BW	14,65-4,87 10,94 +/- 1,60	13,87-6,40 10,13+/-1,49	13,00-6,87 9,71+/-1,25	9,96-6,75 8,94+/-1,08	11,84-6,03 8,52+/-1,28
Ratio (BL/BW)	2,08-1,32 1,93+/- 0,29	2,52-1,28 1,74+/-0,23	2,43-1,31 1,68+/-0,21	3,30-1,94 2,38+/-0,35	6,76-3,39 4,76+/-0,73
PL	0,97-0,10 0,77 +/- 0,11	1,00-0,51 0,70+/-0,09	0,89-0,56 0,71/-0,06	0,77-0,45 0,63+/-0,09	1,05-0,45 0,79+/-0,15
PW	0,63-0,28 0,41+/-0,07	0,83-0,25 0,44+/-0,09	0,57-0,29 0,39+/- 0,05	0,65-0,30 0,43+/-0,10	0,67-0,22 0,43+/-0,10
Ratio(PL/PW)	2,89-0,26 1,89 +/- 0,37	2,5-0,82 1,62+/-0,31	2,72-1,12 1,86+/-0,26	1,88-1,18 1,50+/- 0,21	3,37-1,17 1,90+/-0,44
VS-Vit	18,21-5,96 12,02+/- 2,37	14,3-6,56 9,72+/-1,5	15,48-7,59 10,63+/- 1,60	16,05-10,04 13,25+/-1,64	34,11-12,26 23,04+/-3,99
Vit-P	8,98-2,89 5,39+/- 1,40	7,57-2,63 4,76+/-0,91	5,82-1,72 3,81+/-0,85	9,08-4,17 5,92+/-1,24	21,43-8,96 13,69+/-2,85

Tab.7: Dati morfometrici (valori massimi e minimi, media e deviazione standard) delle *F. hepatica* campionate in Sardegna, Corsica Spagna (Valencia , Galicia) e *F. gigantica* in Burkina Faso . **BL**= body lenght; **BW** =maximum body width; **PL**= pharynx length; **PW**= pharynx width; **VS-Vit**=distance between the ventral sucker and the union of the vitelline glands; **Vit-P** =distance between the union of the vitelline glands and the posterior end of the body;

Elisabetta Pintore

"*Fasciola hepatica* in Sardegna: caratterizzazione fenotipica, valutazione dell'andamento climatico sulla stagionalità, trasmissione e diffusione della parassitosi"

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Sassari

Le fasciole campionate in Sardegna sono state comparate con popolazioni standard mediante un'analisi multivariata in base allo studio dei componenti principali (ACP). Nel grafico n. 1 sono rappresentate le popolazioni sotto forma di perimetri ottenuti da un grafico a dispersione basato sulle prime due componenti principali indicative delle variabili di dimensioni (asse delle x) e forma (asse delle y). La componente principale 1 (CP1) ha il massimo effetto sulle dimensioni dei campioni rappresentati incidendo in questo caso per il 77%. L'esame del grafico dimostra come il "gruppo Sardegna non si sovrappone al gruppo *F. gigantea* (Egitto) mentre evidenza come le fasciole della Sardegna abbiano dimensioni comuni ai gruppi *F. hepatica* standard.

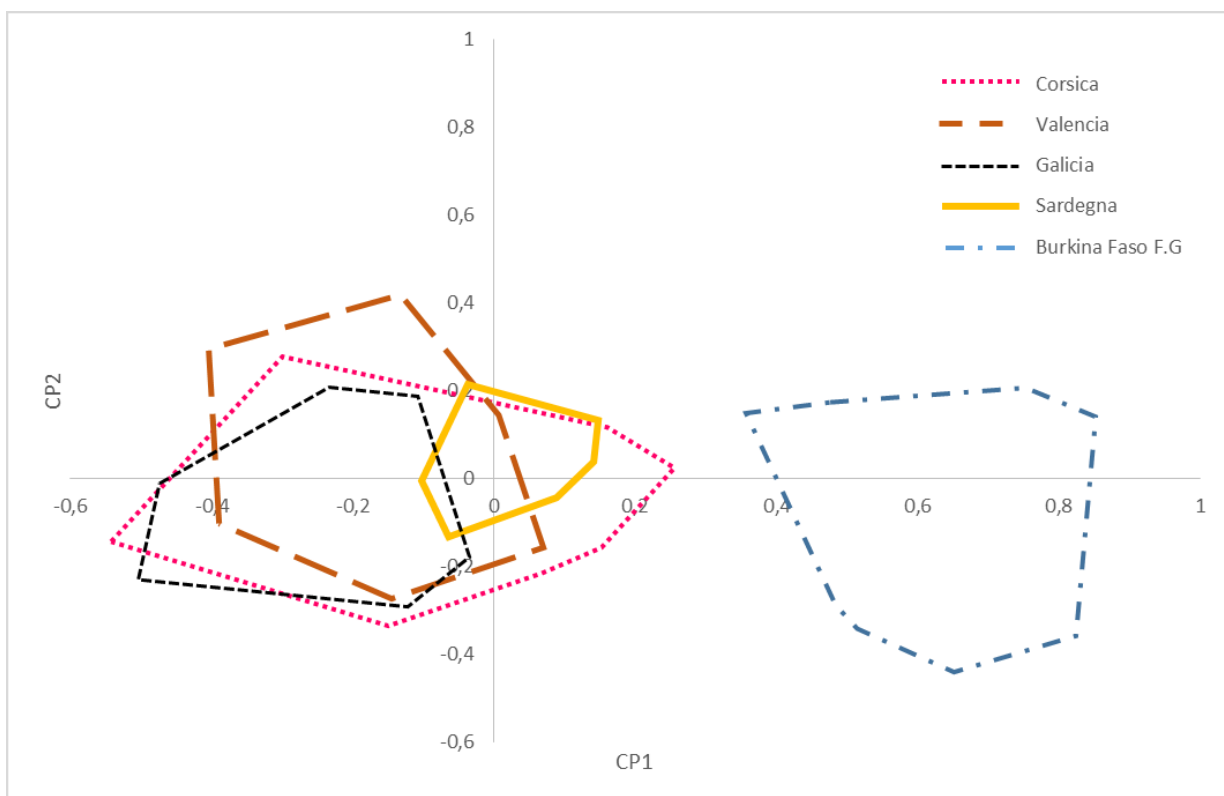


GRAFICO 3 Mappa delle componenti principali (ACP) riportante le diverse popolazioni di fasciole adulte provenienti da specie ovine della Sardegna e popolazioni precedentemente studiate provenienti da Corsica (*F. hepatica*), Valencia (*F. hepatica*) Galicia (*F. hepatica*) Sardegna (*F. hepatica*) e Burkina Faso (*F. gigantea*) (Periago et al., 2006). I campioni sono rappresentati in base ai loro componenti principali (PC1, 77% e PC2, 10%). Ciascun perimetro rappresenta un gruppo distinto.

Elisabetta Pintore

"*Fasciola hepatica* in Sardegna: caratterizzazione fenotipica, valutazione dell'andamento climatico sulla stagionalità, trasmissione e diffusione della parassitosi"

Nel grafico n. 4, generato in base all'analisi dei fattori canonici discriminanti (CDA), sono rappresentate le popolazioni come perimetri ottenuti da un grafico a dispersione basato sui primi due fattori canonici che discriminano la varianza tra gruppi della Sardegna con popolazioni standard di *F. hepatica* provenienti da Spagna (Valencia e Galicia) e Corsica e *F. gigantea* del Burkina Faso. Viene definito "size out" perché l'effetto delle variazioni in base alle dimensioni viene rimosso. L'esame del grafico mostra come le massime distanze siano presenti fra le popolazioni *F. hepatica* dei diversi paesi e quella di *F. gigantea* del Burkina Faso.

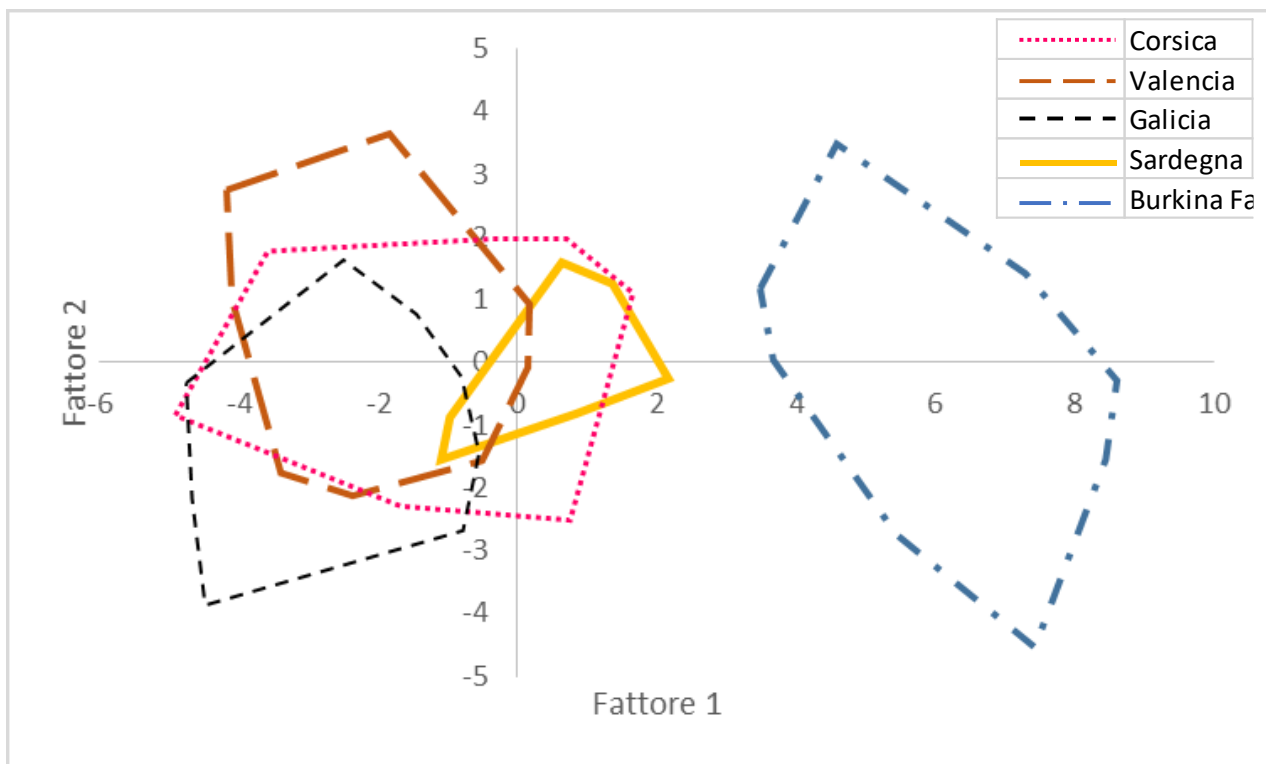


Grafico 4. Grafico dei fattori canonici indipendente dall'effetto dalle dimensioni corrispondente a fasciole adulte provenienti da ovini della Sardegna con popolazioni standard già descritte provenienti da Corsica (*F. hepatica*), Valencia (*F. hepatica*), Galicia (*F. hepatica*), Sardegna (*F. hepatica*) e Burkina Faso (*F. gigantea*) (Periago et al., 2006). Ogni perimetro rappresenta un gruppo.

Le distanze di Mahalanobis rappresentate nella tabella 8, confermano i risultati rappresentati nel Grafico n. 4.

Mahalanobis	Corsica	Valencia	Galicia	Sardegna	B.Faso
Corsica	0				
Valencia	1,33	0			
Galicia	1,82	1,47	0		
Sardegna	1,99	2,51	3,11	0	
B.Faso	7,24	8,19	8,73	5,96	0

Tabella 8. Distanze di Mahalanobis

Meteo

Studio della omogeneità o eterogeneità tra le aree esaminate.

Dalle tabelle 9 alla 15 vengono riportati i parametri relativi alla temperatura minima media mensile, temperatura massima media mensile, temperatura media mensile, Evapotraspirazione ambientale, precipitazioni medie mensili, umidità relativa relativamente al trentennio 1988 - 2017 nelle stazioni meteorologiche di Alghero, Capo Bellavista, Capo Carbonara, Capo Frasca, Decimomannu, Olbia e Perdasdefogu. Tutte le medie mensili dal 1988 al 2017 per ogni stazione sono riportate all'interno di climadiagrammi (Grafici 5-11) (Fuentes et al., 1999). I climadiagrammi sono stati fondamentali anche al fine di valutare la stagionalità di trasmissione della patologia.

Elisabetta Pintore

"*Fasciola hepatica* in Sardegna: caratterizzazione fenotipica, valutazione dell'andamento climatico sulla stagionalità, trasmissione e diffusione della parassitosi"

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Sassari

Stazione meteorologica di Alghero

Altitudine 23 m.s.l.m. 40° 38' 22.74" N 8° 17' 33.12" E

Mese	Min T m	Max T m	Media T	Precipit m	Evapotras	Umidità rel
Gennaio	4,48	13,90	9,42	41,73	1,13	80,70
Febbraio	4,25	13,51	9,10	52,31	1,49	79,44
Marzo	5,75	15,26	11,38	35,28	2,17	78,67
Aprile	7,94	18,35	14,78	48,12	3,24	76,81
Maggio	10,50	22,47	16,41	47,35	4,38	74,54
Giugno	14,38	26,84	20,35	17,18	5,25	70,46
Luglio	17,28	29,90	22,79	11,58	5,58	68,27
Agosto	17,10	30,29	22,75	7,04	4,99	69,38
Settembre	14,74	26,39	21,68	38,84	3,67	73,26
Ottobre	11,51	22,02	16,17	73,35	2,24	78,13
Novembre	8,12	17,84	12,98	73,10	1,47	78,55
Dicembre	5,75	14,88	11,05	84,23	1,06	80,07

Tabella 9 Medie mensili 1988-2017 nella stazione meteorologica di Alghero

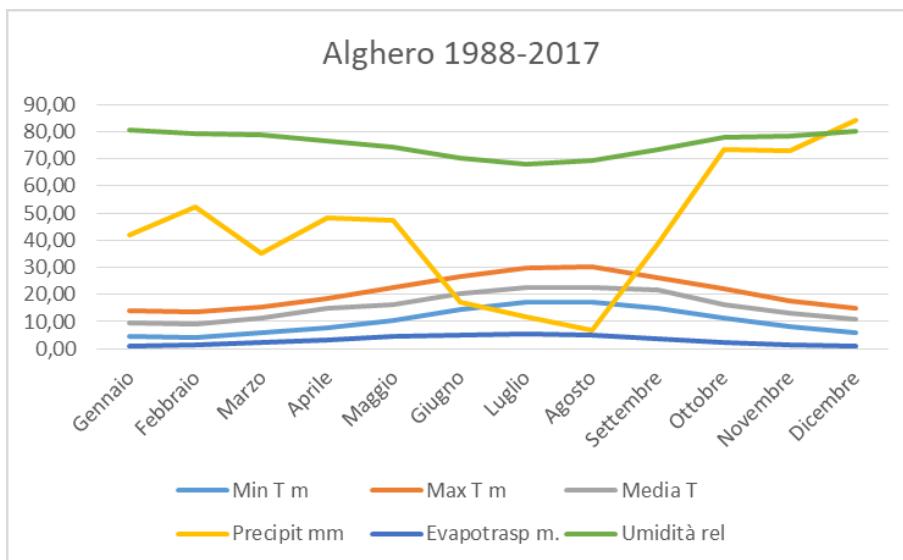


Grafico 5: Climadiagramma Alghero 1988-2017

Elisabetta Pintore

“*Fasciola hepatica* in Sardegna: caratterizzazione fenotipica, valutazione dell’andamento climatico sulla stagionalità, trasmissione e diffusione della parassitosi”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Sassari

Stazione meteorologica di Capo Bellavista

Altitudine 156 m.s.l.m. 39 55'49.27"N 9 42'48.06" E

Mese	Min T m	Max T m	Media T	Precipit m	Evapotras	Umidità re
Gennaio	7,20	13,48	10,34	41,76	1,01	71,68
Febbraio	6,99	13,85	10,42	23,11	1,41	69,06
Marzo	8,59	16,02	12,30	28,99	2,12	70,05
Aprile	10,56	18,44	14,50	35,19	2,95	70,23
Maggio	13,82	22,23	18,03	18,92	3,87	69,42
Giugno	17,84	27,04	22,44	7,20	4,79	68,36
Luglio	20,99	30,05	22,44	5,81	4,92	68,08
Agosto	20,73	30,32	22,44	11,66	4,55	68,55
Settembre	17,26	25,52	22,44	40,60	2,88	70,18
Ottobre	15,25	22,98	22,44	50,85	2,15	71,70
Novembre	11,22	17,51	22,44	64,61	1,24	70,22
Dicembre	8,10	14,68	22,44	54,22	0,91	68,49

Tabella 10: Medie mensili 1988-2017 nella stazione meteorologica di Capo Bellavista

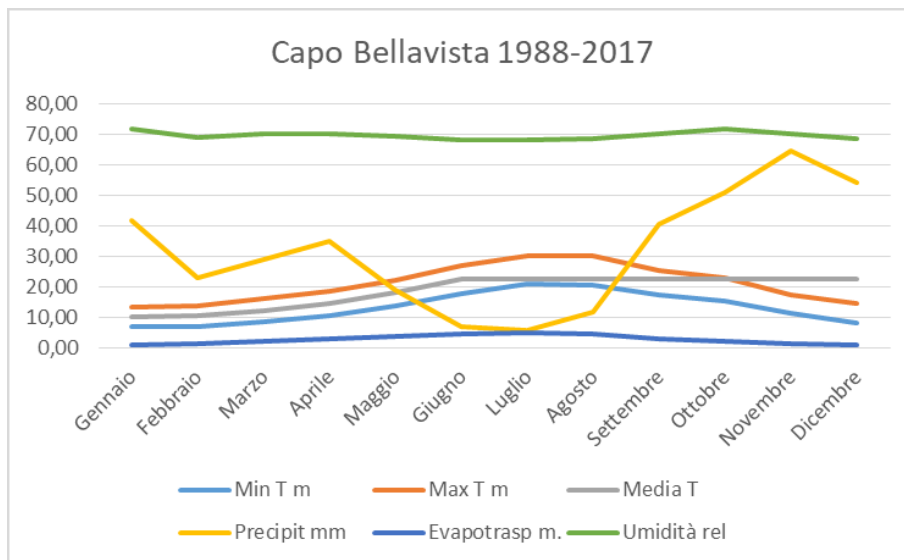


Grafico 6: Climadiagramma del periodo 1988-2017 per la stazione meteorologica di Capo Bellavista

Elisabetta Pintore

“*Fasciola hepatica* in Sardegna: caratterizzazione fenotipica, valutazione dell’andamento climatico sulla stagionalità, trasmissione e diffusione della parassitosi”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Sassari

Stazione Meteorologica di Capo Carbonara

Altitudine 118 m.s.l.m.

Coordinate 39 06'13.35"N 9 30'49.73"E

Mese	Min T m	Max T m	Media T	Precipit m	Evapotras	Umidità re
Gennaio	9,20	14,32	12,03	23,29	3,39	76,02
Febbraio	8,81	14,35	11,38	24,40	3,71	75,43
Marzo	9,99	15,94	15,88	23,53	1,95	75,23
Aprile	11,45	18,08	18,51	29,03	4,95	73,40
Maggio	13,91	22,37	18,14	17,09	3,89	69,25
Giugno	17,84	27,04	22,44	7,20	4,79	68,02
Luglio	20,91	30,04	25,47	5,81	4,92	68,08
Agosto	21,40	30,32	25,86	11,66	4,55	68,31
Settembre	18,19	25,91	22,05	38,14	3,23	68,16
Ottobre	15,25	22,90	19,08	50,95	2,13	71,30
Novembre	11,22	17,51	14,36	64,61	1,24	70,22
Dicembre	8,10	14,68	11,15	54,22	0,91	68,49

Tabella 11: Medie mensili nel periodo 1988-2017 per la stazione meteorologica di Capo Carbonara

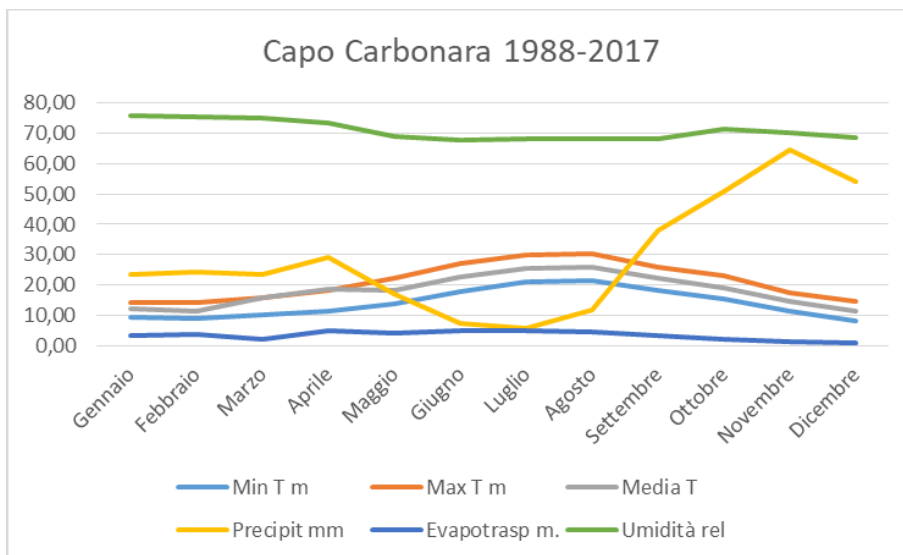


Grafico 7: Climadiagramma periodo 1988-2017 per la stazione Meteorologica di Capo Carbonara

Elisabetta Pintore

“*Fasciola hepatica* in Sardegna: caratterizzazione fenotipica, valutazione dell’andamento climatico sulla stagionalità, trasmissione e diffusione della parassitosi”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Sassari

Stazione meteorologica di Capo Frasca

Altitudine 92 m.s.l.m.

Coordinate 39 44'23.59"N 8 27'34.15"E

Mese	Min T m	Max T m	Media T	Precipit m	Evapotras	Umidità re
Gennaio	7,23	12,66	9,95	53,61	6,80	84,28
Febbraio	6,99	12,76	9,87	49,40	4,10	81,10
Marzo	8,40	14,82	11,61	31,07	1,93	82,29
Aprile	10,51	17,19	13,85	47,37	11,33	81,42
Maggio	13,69	21,04	17,36	28,37	4,41	79,07
Giugno	17,51	31,67	24,59	13,75	14,94	79,02
Luglio	19,64	27,26	23,45	3,22	8,74	80,36
Agosto	20,55	28,43	24,49	5,11	11,35	80,02
Settembre	18,12	25,23	21,68	38,70	2,92	79,60
Ottobre	15,27	22,34	18,80	58,51	4,83	82,96
Novembre	11,28	17,31	14,30	78,68	1,19	83,86
Dicembre	8,18	13,38	10,78	62,99	0,92	84,59

Tabella 12: Medie mensili nel periodo 1988-2017 per la stazione meteorologica di Capo Frasca

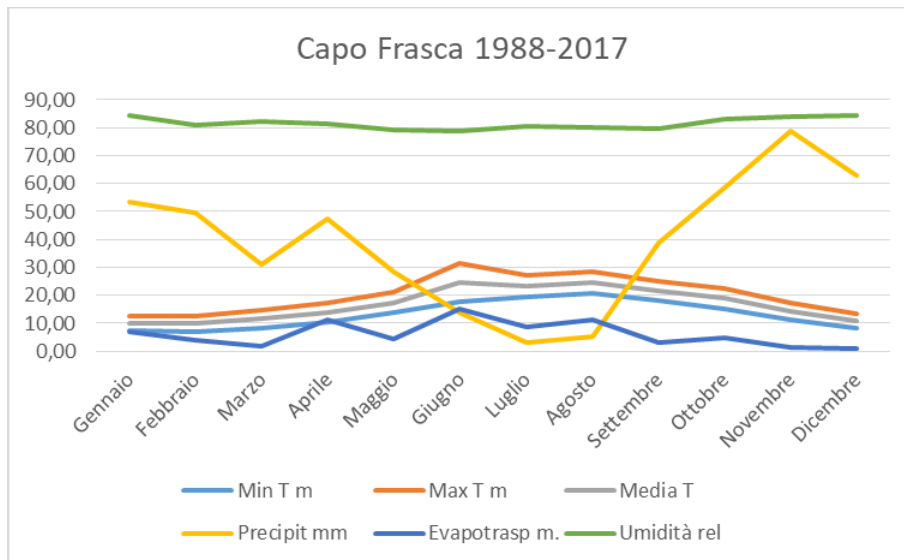


Grafico 8: Climadiagramma 1988-2017 per la stazione Meteorologica di Capo Frasca

Elisabetta Pintore

“Fasciola hepatica in Sardegna: caratterizzazione fenotipica, valutazione dell’andamento climatico sulla stagionalità, trasmissione e diffusione della parassitosi”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Sassari

Stazione Meteorologica di Decimomannu

Altitudine 28 m.s.l.m.

Coordinate 39°20'38.28"N 8°58'14.52"E

Mese	Min T m	Max T m	Media T	Precipit m	Evapotras	Umidità re
Gennaio	4,28	14,01	9,14	49,11	4,05	79,77
Febbraio	4,24	14,59	9,42	48,65	4,27	76,41
Marzo	5,75	16,97	11,36	44,48	5,04	72,86
Aprile	8,01	19,89	13,95	88,83	5,54	69,00
Maggio	11,57	24,52	18,03	25,22	6,73	63,42
Giugno	15,44	29,11	21,41	14,40	7,20	57,85
Luglio	18,56	32,23	24,54	4,05	7,67	56,45
Agosto	19,28	32,91	25,24	12,45	7,38	60,06
Settembre	16,30	28,31	22,30	31,84	3,87	68,72
Ottobre	13,11	23,33	20,28	54,58	7,59	75,19
Novembre	8,64	18,18	13,41	97,61	4,19	78,01
Dicembre	5,20	14,32	9,77	90,67	3,79	78,77

Tabella 13: Medie mensili nel periodo 1988-2017 per la stazione meteorologica di Decimomannu

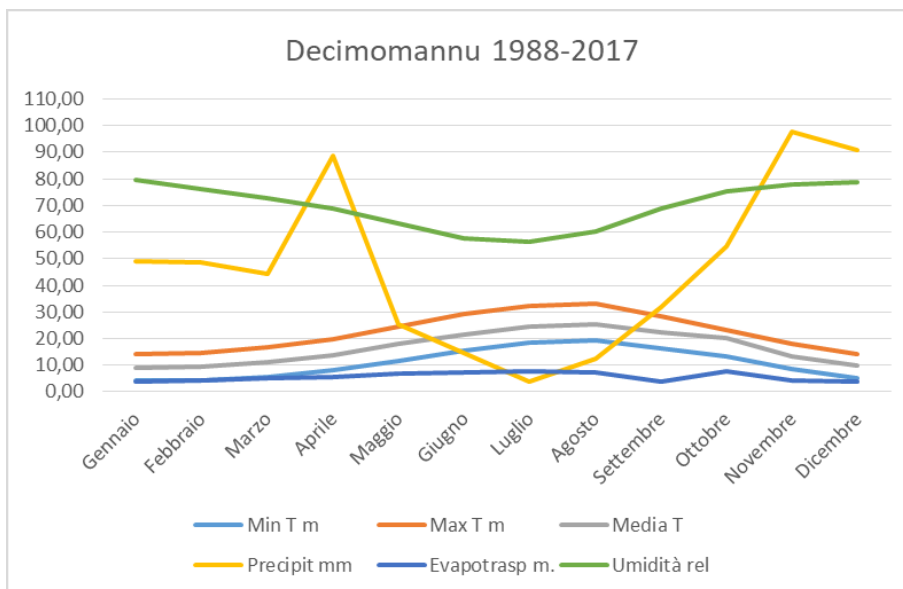


Grafico 9: Climadiagramma periodo 1988-2017 per la stazione Meteorologica di Decimomannu

Elisabetta Pintore

“*Fasciola hepatica* in Sardegna: caratterizzazione fenotipica, valutazione dell’andamento climatico sulla stagionalità, trasmissione e diffusione della parassitosi”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Sassari

Stazione meteorologica di Olbia

Altitudine 13 m.s.l.m. 40°54'06.51"N 9°31'34.42"E

Mese	Min T m	Max T m	Media T	Precipit m	Evapotras	Umidità re
Gennaio	4,23	13,61	8,92	43,21	1,18	76,90
Febbraio	4,51	13,48	9,00	35,27	1,49	73,94
Marzo	5,73	16,54	11,13	42,68	2,31	72,78
Aprile	7,37	17,61	12,49	38,15	3,16	71,61
Maggio	10,42	22,72	16,57	21,25	4,47	68,08
Giugno	14,53	27,18	20,75	12,60	7,58	62,58
Luglio	17,75	30,92	24,33	6,10	5,77	60,20
Agosto	17,42	31,22	24,32	17,06	5,31	62,63
Settembre	13,98	26,63	20,31	42,30	3,89	70,92
Ottobre	10,06	21,41	15,74	76,82	2,37	76,25
Novembre	6,96	16,62	11,79	62,38	1,36	77,51
Dicembre	4,95	14,13	9,54	46,83	1,03	75,63

Tabella 14: Medie mensili nel periodo 1988-2017 per la stazione meteorologica di Olbia

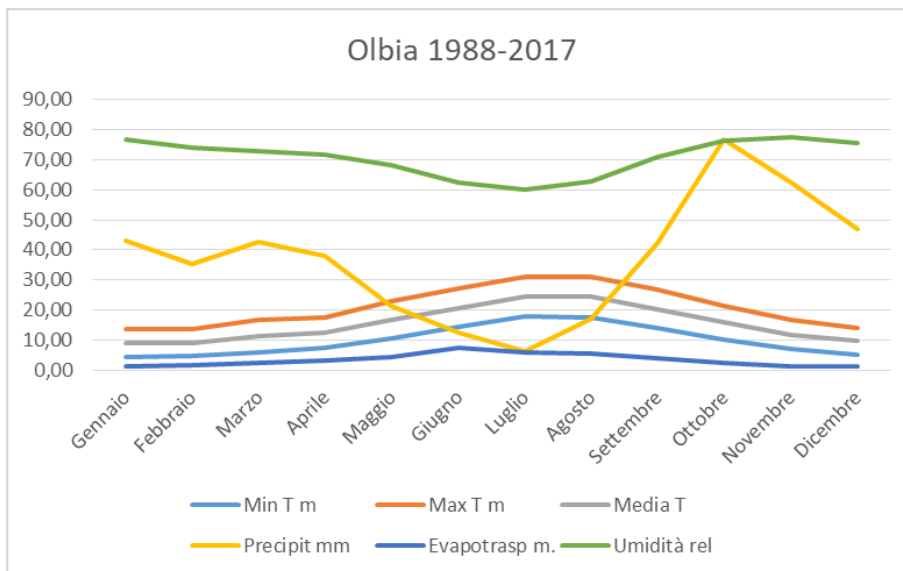


Grafico 10: Climadiagramma periodo 1988-2017 per la stazione Meteorologica di Olbia

Elisabetta Pintore

“Fasciola hepatica in Sardegna: caratterizzazione fenotipica, valutazione dell’andamento climatico sulla stagionalità, trasmissione e diffusione della parassitosi”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Sassari

Stazione meteorologica di Perdasdefogu

Altitudine 604 m.s.l.m. Coordinate 39°40'25.84"N 9°26'28.46"E

Mese	Min T m	Max T m	Media T	Precipit m	Evapotras	Umidità re
Gennaio	3,89	9,69	6,79	71,98	0,81	79,70
Febbraio	3,61	10,21	6,91	52,50	1,21	69,70
Marzo	7,68	11,86	8,56	46,46	1,69	66,79
Aprile	6,43	15,69	10,06	36,51	2,51	67,31
Maggio	10,11	19,89	14,06	26,62	3,54	64,36
Giugno	14,02	24,43	18,81	17,28	4,59	52,05
Luglio	17,22	28,33	22,37	15,24	5,06	47,47
Agosto	17,57	28,44	22,60	16,28	4,50	56,34
Settembre	14,67	24,06	18,96	41,16	3,15	66,34
Ottobre	11,87	19,70	15,59	41,65	1,98	73,45
Novembre	8,37	14,87	11,42	81,52	1,10	76,85
Dicembre	5,20	10,91	7,85	67,56	0,75	78,41

Tabella 15: Medie mensili nel periodo 1988-2017 per la stazione meteorologica di Perdasdefogu

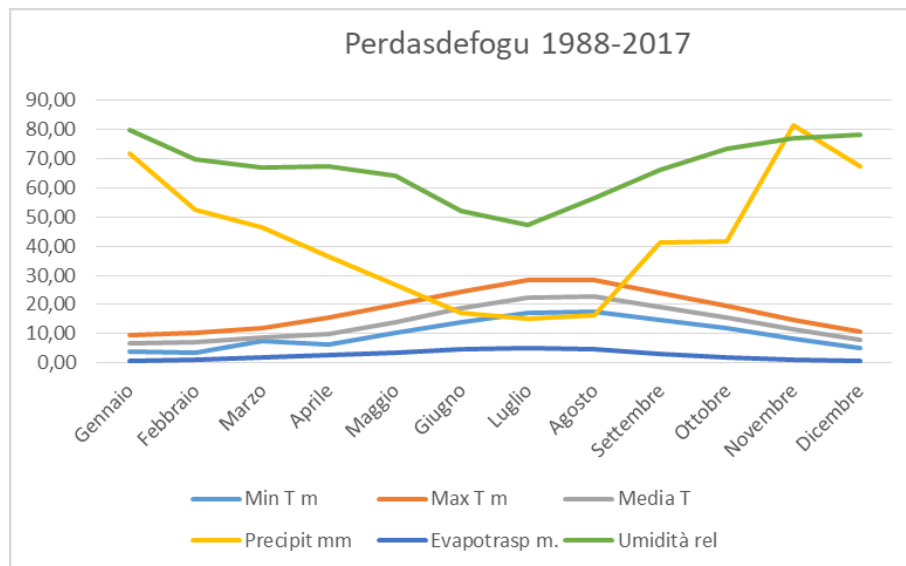


Grafico 11: Climadiagramma periodo 1988-2017 per la stazione Meteorologica di Perdasdefogu

Il confronto tra i climadiagrammi delle diverse stazioni meteorologiche, effettuato su base descrittiva, non sembra evidenziare variazioni relativamente alle temperature, mentre si rilevano variazioni relative a precipitazioni umidità ed evapotraspirazione.

Elisabetta Pintore

“*Fasciola hepatica* in Sardegna: caratterizzazione fenotipica, valutazione dell’andamento climatico sulla stagionalità, trasmissione e diffusione della parassitosi”

Studio della stagionalità

Lo studio della stagionalità è stato effettuato calcolando l'MT medio mensile dove ciascun mese è la media dei 30 mesi corrispondenti nel periodo dal 1988-2017. È stata quindi analizzata la sua variazione nel corso dei mesi dell'anno per ogni stazione meteorologica. I valori di MT vengono riportati nelle tabelle 16-22, mentre il loro andamento viene rappresentato nei grafici 12-18.

Mettendo in relazione i climadiagrammi con la curva dell'MT medio mensile, si è potuto considerare come valore critico di MT per la Sardegna sia 60 (indicato da una linea tratteggiata rossa).

Stazione Meteorologica di Alghero

Gennaio	Febbraio	Marzo	Aprile	Maggio	Giugno	Luglio	Agosto	Settembre	Ottobre	Novembre	Dicembre
72,72	74,19	57,70	71,05	44,65	17,84	10,12	13,92	41,92	74,43	95,48	99,06

Tabella 16: Stazione meteorologica di Alghero valori di MT medio mensile anni 1988-2017 a

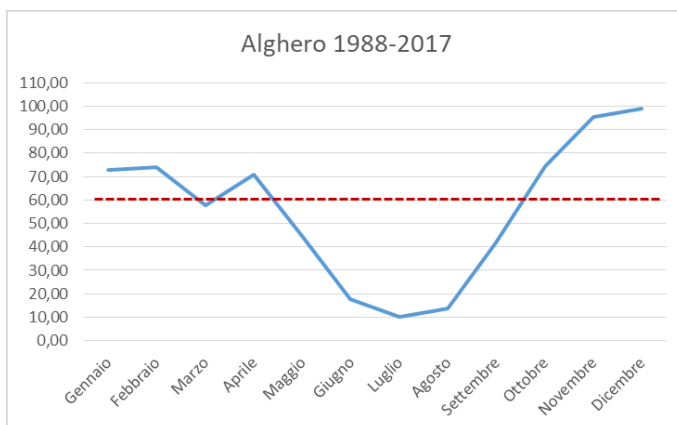


Grafico 12: Stazione meteorologica di Alghero Evoluzione dell' MT medio 1988-2017.

.

Elisabetta Pintore

"*Fasciola hepatica* in Sardegna: caratterizzazione fenotipica, valutazione dell'andamento climatico sulla stagionalità, trasmissione e diffusione della parassitosi"

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Sassari

Stazione meteorologica di Capo Bellavista

Gennaio	Febbraio	Marzo	Aprile	Maggio	Giugno	Luglio	Agosto	Settembre	Ottobre	Novembre	Dicembre
69,51	58,99	54,21	56,61	39,13	21,85	20,36	17,40	43,97	61,12	82,84	76,16

Tab 17: Valori di MT medio mensile per il periodo 1988-2017 per la stazione meteorologica di Capo Bellavista.

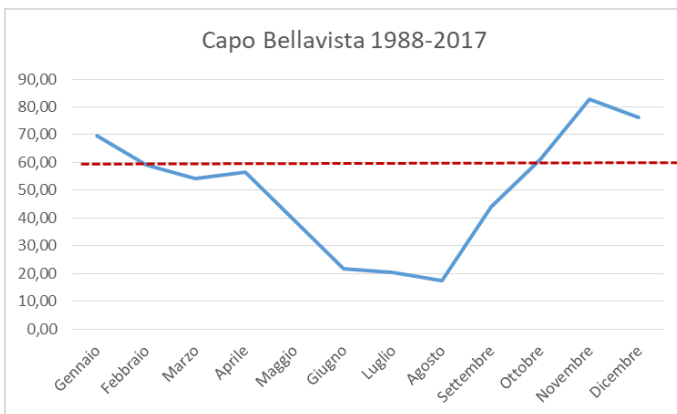


Grafico 13: Stazione meteorologica di Capo Bellavista Evoluzione dell' MT medio 1988-2017.

Stazione meteorologica Capo Carbonara

Gennaio	Febbraio	Marzo	Aprile	Maggio	Giugno	Luglio	Agosto	Settembre	Ottobre	Novembre	Dicembre
72,66	65,54	63,73	68,26	45,34	24,12	14,25	19,12	53,00	63,56	82,85	81,59

Tabella 18 : Stazione meteorologica di Capo Carbonara 1988-2017 valori di MT medio mensile.

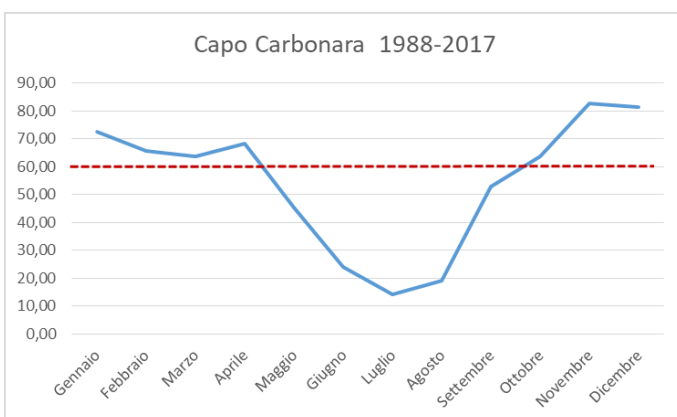


Grafico 14: Stazione meteorologica di Capo Carbonara. Evoluzione dell' MT medio 1988-2017.

Elisabetta Pintore

"Fasciola hepatica in Sardegna: caratterizzazione fenotipica, valutazione dell'andamento climatico sulla stagionalità, trasmissione e diffusione della parassitosi"

Stazione meteorologica di Capo Frasca

Gennaio	Febbraio	Marzo	Aprile	Maggio	Giugno	Luglio	Agosto	Settembre	Ottobre	Novembre	Dicembre
71,42	68,96	71,57	68,76	55,07	24,56	14,58	14,82	47,97	57,18	87,07	84,22

Tabella 19: Stazione meteorologica di Capo Frasca 1988-2017 valori di MT medio mensile.

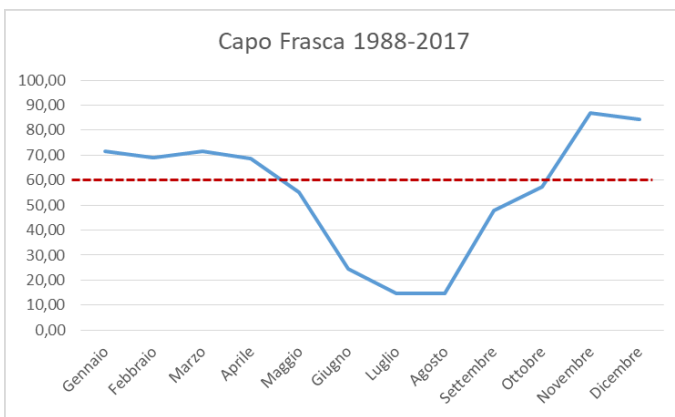


Grafico 15: Stazione meteorologica di Capo Carbonara : Evoluzione dell' MT medio 1988-2017.

Stazione Meteorologica di Decimomannu

Gennaio	Febbraio	Marzo	Aprile	Maggio	Giugno	Luglio	Agosto	Settembre	Ottobre	Novembre	Dicembre
76,33	71,22	63,25	87,30	44,17	22,33	13,69	15,83	42,73	67,23	98,22	102,88

Tab 20 Stazione meteorologica di Decimomannu: valori di MT medio mensile 1988-2017.

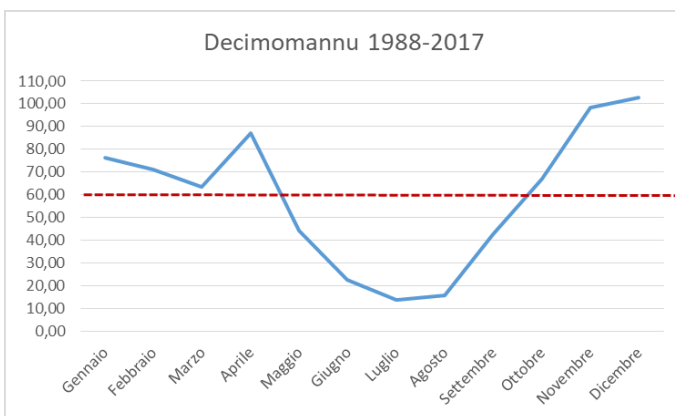


Grafico 16: Stazione meteorologica Decimomannu: Evoluzione dell' MT medio 1988-2017.

Elisabetta Pintore

"Fasciola hepatica in Sardegna: caratterizzazione fenotipica, valutazione dell'andamento climatico sulla stagionalità, trasmissione e diffusione della parassitosi"

Stazione meteorologia di Olbia

Gennaio	Febbraio	Marzo	Aprile	Maggio	Giugno	Luglio	Agosto	Settembre	Ottobre	Novembre	Dicembre
76,11	70,88	70,57	68,40	42,78	22,13	12,89	20,50	51,31	69,89	87,55	83,56

Tabella 21: Stazione meteorologica di Olbia: valori di MT medio mensile 1988-2017.

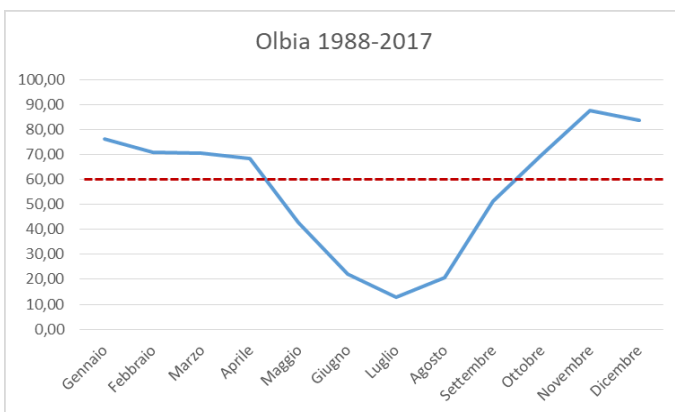


Grafico 17: Stazione meteorologica Olbia. Evoluzione dell' MT medio 1988-2017.

Stazione meteorologica di Perdasdefogu

Gennaio	Febbraio	Marzo	Aprile	Maggio	Giugno	Luglio	Agosto	Settembre	Ottobre	Novembre	Dicembre
89,31	48,46	56,20	38,32	27,45	17,68	10,66	20,50	44,54	61,94	80,09	83,61

Tabella 22: Stazione meteorologica di Perdasdefogu: valori di MT medio mensile 1988-2017.

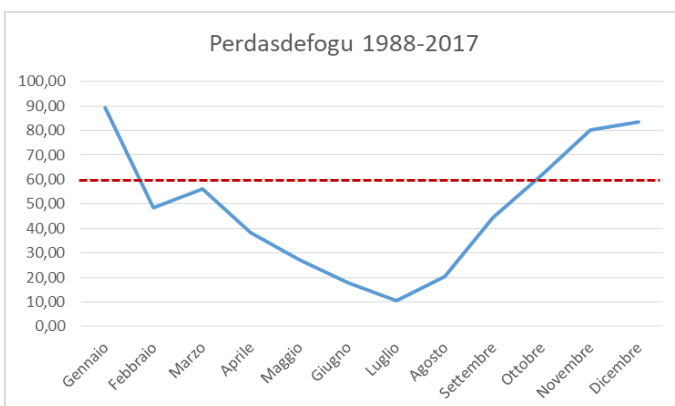


Grafico 18: Stazione meteorologica Olbia: Evoluzione dell' MT medio 1988-2017.

Elisabetta Pintore

"Fasciola hepatica in Sardegna: caratterizzazione fenotipica, valutazione dell'andamento climatico sulla stagionalità, trasmissione e diffusione della parassitosi"

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Sassari

MT riepilogo tutte le stazioni

Nel Grafico 19 vengono riportate in un solo grafico tutte le curve rappresentanti l'andamento dell'MT mensile per ciascuna stazione meteorologica analizzata.

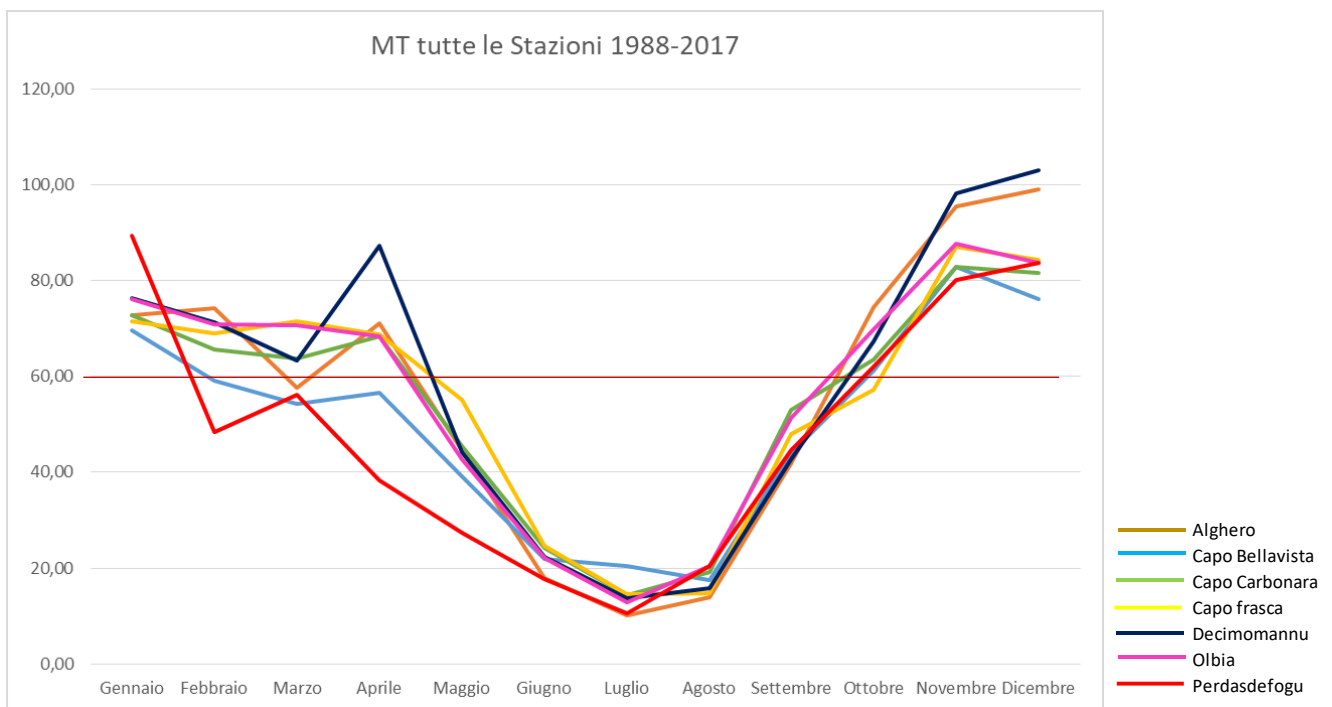


Grafico 19: curve Mt mensili di ciascuna stazione meteorologica.

dall'esame del grafico 19 si rileva che l'MT scende sotto il valore 60, valore sotto il quale la trasmissione di *F. hepatica* in Sardegna è bloccata, nei mesi da maggio a settembre in presenza di temperature elevate, scarse precipitazioni, maggiore evapotraspirazione e bassa umidità.

Elisabetta Pintore

"*Fasciola hepatica* in Sardegna: caratterizzazione fenotipica, valutazione dell'andamento climatico sulla stagionalità, trasmissione e diffusione della parassitosi"

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Sassari

Impatto del cambio climatico

L'impatto del cambiamento climatico nei confronti di *F. hepatica* in Sardegna è stato studiato attraverso la valutazione dell'MT medio annuo e dalla sua evoluzione nel trentennio 1988 - 2107 nelle diverse stazioni meteo. Nelle tabelle, per ciascuna stazione meteorologica, viene rappresentato l'andamento dell'MT medio annuo rilevato dal 1988 al 2017. Sulla base degli MT medi annui è stata calcolata la regressione lineare e ne è stata valutata la sua significatività statistica ($p < 0,05$).

Le tabelle di seguito riportate mostrano l'andamento dell'MT nel corso dei 30 anni considerando l'MT medio annuo e non quello mensile.

Stazione meteorologica di Alghero

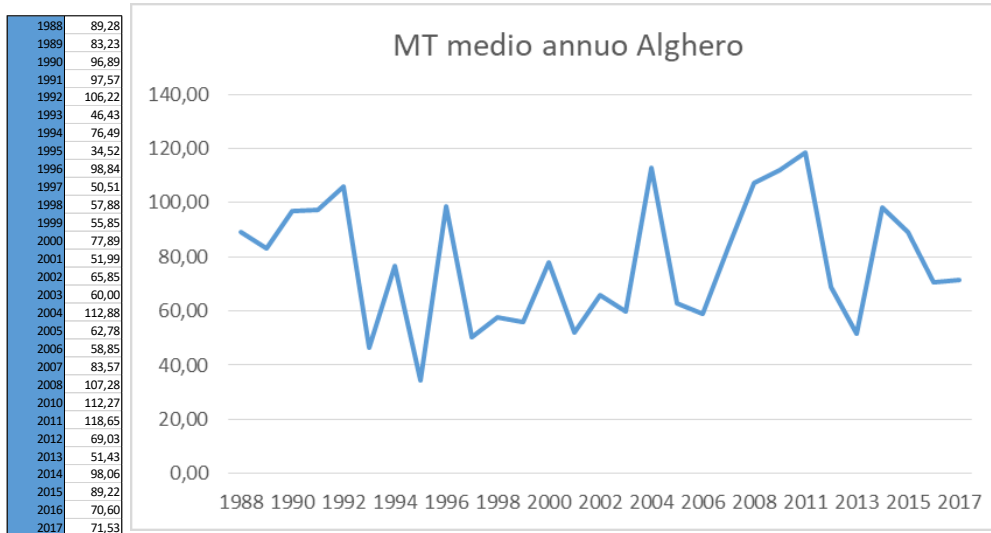


Gráfico 20: andamento MT medio annuo 1988-2017.

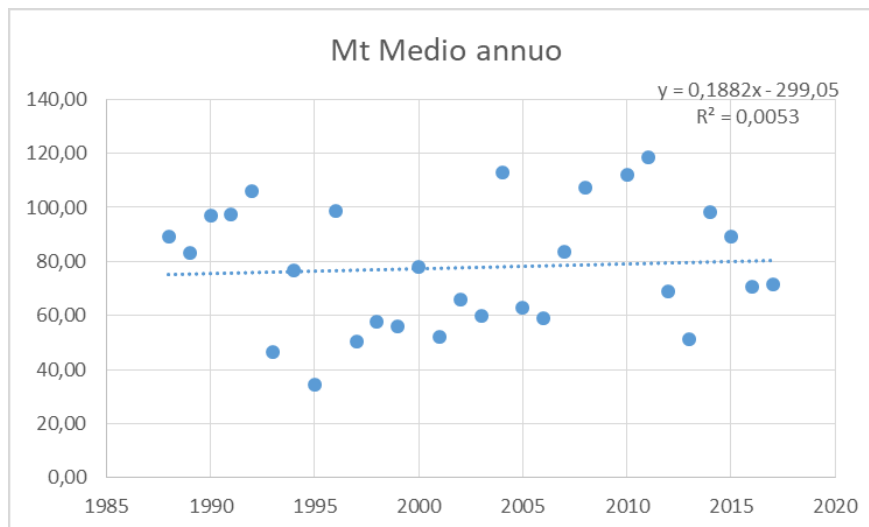


Gráfico 21: stazione meteo di Alghero 1988-2017: regressione lineare dell'andamento dell'MT.

La regressione lineare effettuata sull'andamento dell'MT nella stazione meteo di Alghero (1988-2017) evidenzia come ci sia stato aumento, seppur non statisticamente significativo, di detto valore ($p=0,70$).

Elisabetta Pintore

"Fasciola hepatica in Sardegna: caratterizzazione fenotipica, valutazione dell'andamento climatico sulla stagionalità, trasmissione e diffusione della parassitosi"

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Sassari

Stazione meteorologica di Capo Bellavista

1988	52,63
1989	48,74
1990	78,42
1991	65,82
1992	67,92
1993	71,05
1994	58,50
1995	33,19
1996	93,84
1997	49,21
1998	45,62
1999	65,08
2000	56,03
2002	51,48
2003	64,65
2004	62,14
2005	83,88
2006	52,48
2007	53,42
2008	78,54
2009	75,36
2010	103,41
2011	91,05
2012	61,75
2013	68,12
2014	70,45
2015	73,96
2016	70,83
2017	59,74

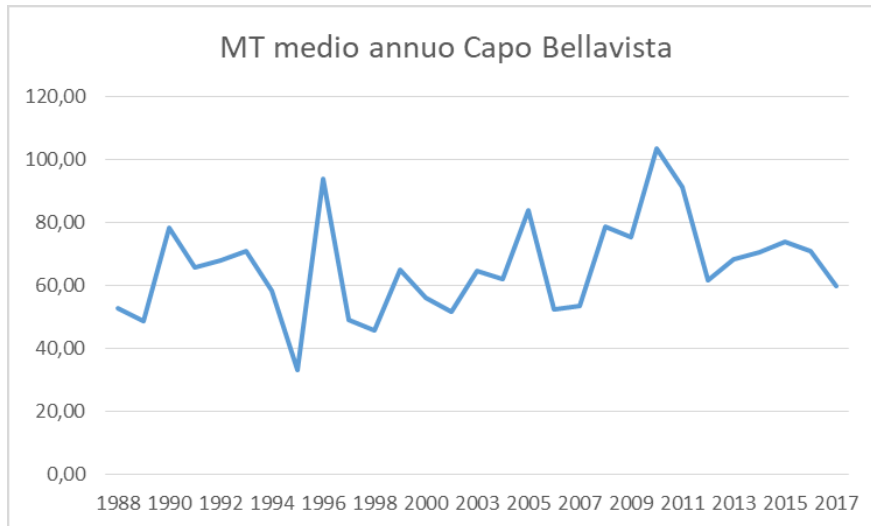


Grafico 22: andamento MT medio annuo 1988-2017 stazione di Capo Bellavista.

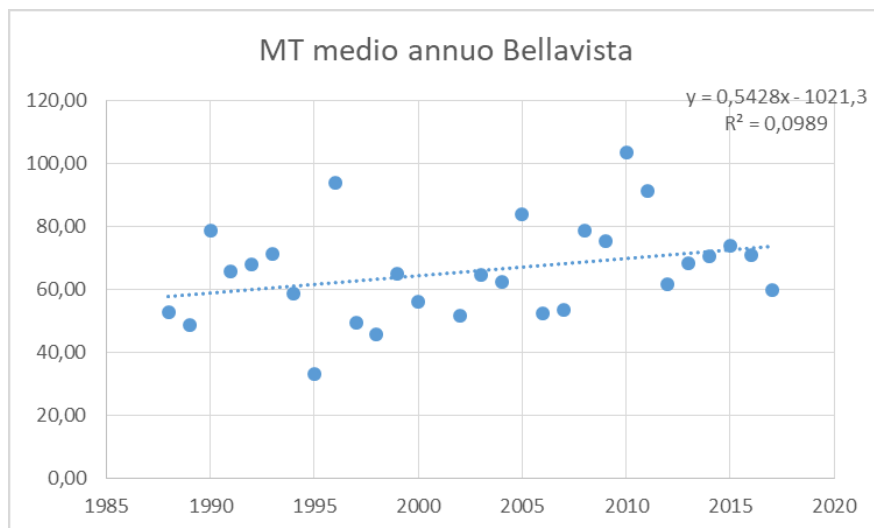


Grafico 23: stazione meteo di Capo Bellavista 1988-2017: regressione lineare dell'andamento dell'MT medio annuo.

La regressione lineare effettuata sull'andamento dell'MT nella stazione meteo di Capo Bellavista (1988-2017) evidenzia come ci sia stato aumento, seppur non statisticamente significativo, di detto valore ($P=0,09$).

Elisabetta Pintore

"*Fasciola hepatica* in Sardegna: caratterizzazione fenotipica, valutazione dell'andamento climatico sulla stagionalità, trasmissione e diffusione della parassitosi"

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Sassari

Stazione Meteorologica di Capo Carbonara

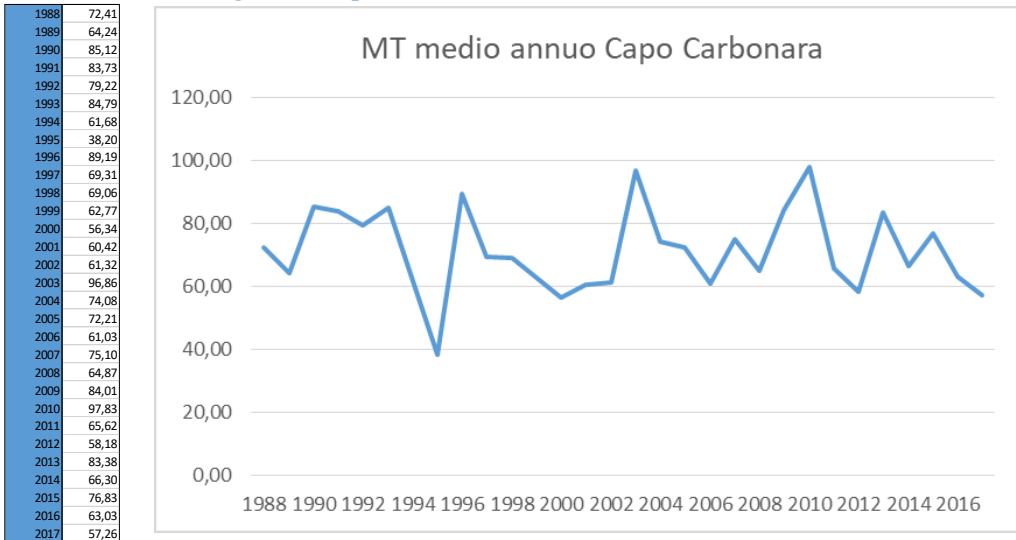


Grafico 24: andamento MT medio annuo 1988-2017 stazione di Capo Carbonara.

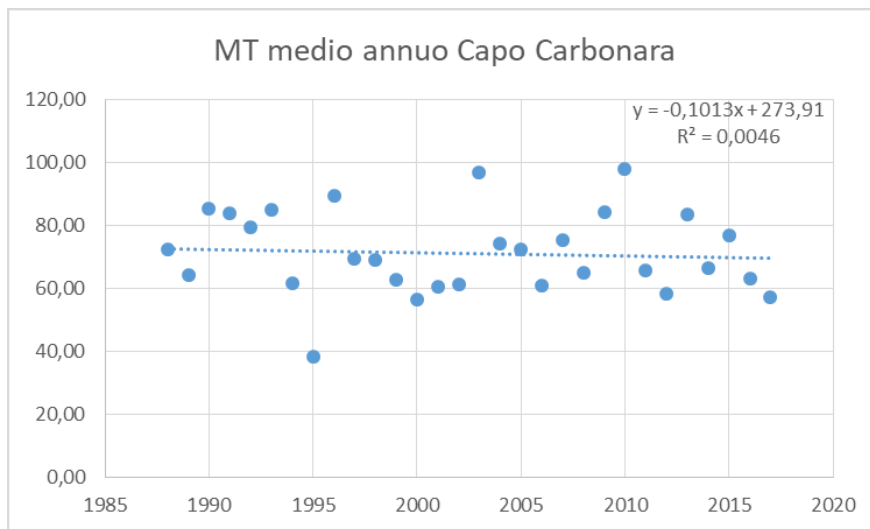


Grafico 25: stazione meteo di Capo Carbonara 1988-2017: regressione lineare dell'andamento dell'MT medio annuo.

La regressione lineare effettuata sull'andamento dell'MT nella stazione meteo di Capo Carbonara (1988-2017) evidenzia come sia apprezzabile solo una leggera diminuzione, seppur non statisticamente significativa, di detto valore ($P=0,722$).

Elisabetta Pintore

"Fasciola hepatica in Sardegna: caratterizzazione fenotipica, valutazione dell'andamento climatico sulla stagionalità, trasmissione e diffusione della parassitosi"

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Sassari

Stazione Meteo di Capo Frasca

1988	59,35
1989	51,85
1990	126,86
1991	89,21
1992	70,01
1993	60,51
1994	67,07
1995	34,21
1996	90,63
1997	56,08
1998	41,13
1999	53,76
2000	44,80
2001	68,12
2002	63,62
2003	68,36
2004	110,66
2005	71,07
2006	67,62
2007	80,23
2008	62,59
2009	103,78
2010	83,83
2011	79,83
2012	68,35
2013	96,31
2014	88,74
2015	70,99
2016	76,59
2017	70,35

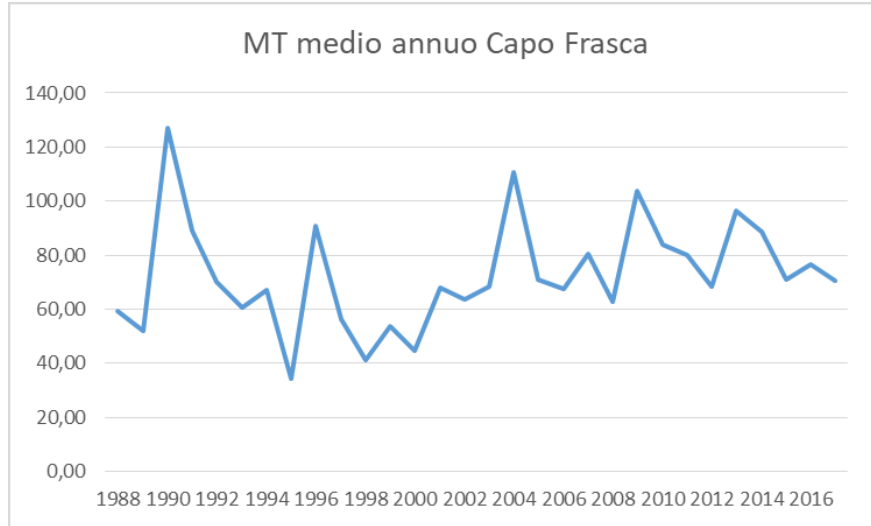


Grafico 26: andamento MT medio annuo 1988-2017 stazione di Capo Bellavista.

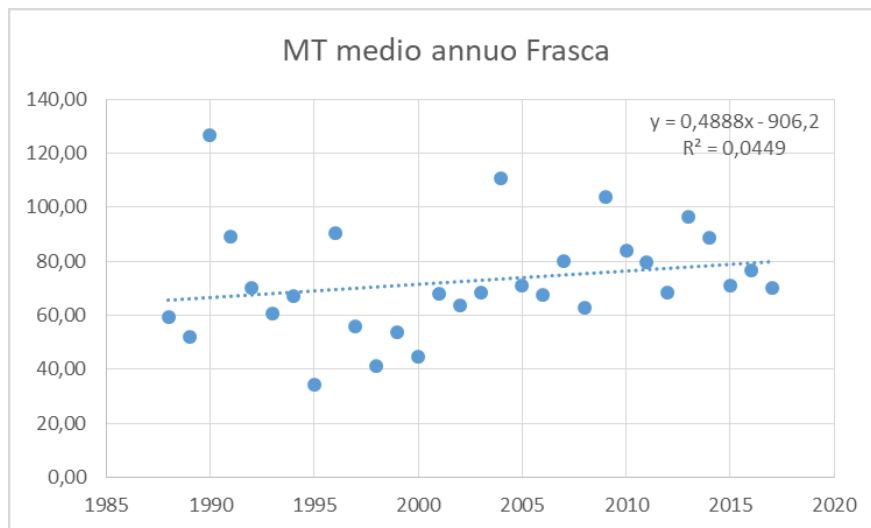


Grafico 27: stazione meteo di Capo Frasca 1988-2017: regressione lineare dell'andamento dell'MT medio annuo.

La regressione lineare effettuata sull'andamento dell'MT nella stazione meteo di Capo Frasca (1988-2017) evidenzia come ci sia stato un aumento, seppur non statisticamente significativo, di detto valore ($P = 0,26$).

Elisabetta Pintore

"*Fasciola hepatica* in Sardegna: caratterizzazione fenotipica, valutazione dell'andamento climatico sulla stagionalità, trasmissione e diffusione della parassitosi"

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Sassari

Stazione Meteorologica di Decimomannu

1988	58,58
1989	41,49
1990	91,80
1991	74,77
1992	71,70
1993	68,40
1994	51,53
1995	39,49
1996	79,46
1997	92,46
1998	73,93
1999	55,29
2000	57,94
2001	72,68
2002	124,94
2003	79,58
2004	60,26
2005	77,84
2006	78,78
2007	92,64
2008	143,23
2009	94,49
2010	132,44
2011	153,68
2012	83,02
2013	77,49
2014	72,20
2015	60,65

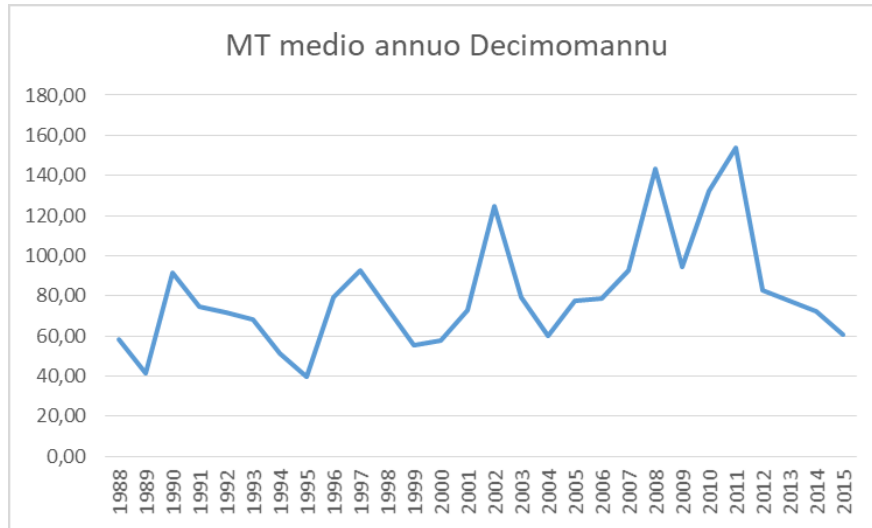


Grafico 28 : andamento MT medio annuo 1988-2017 stazione di Capo Bellavista.

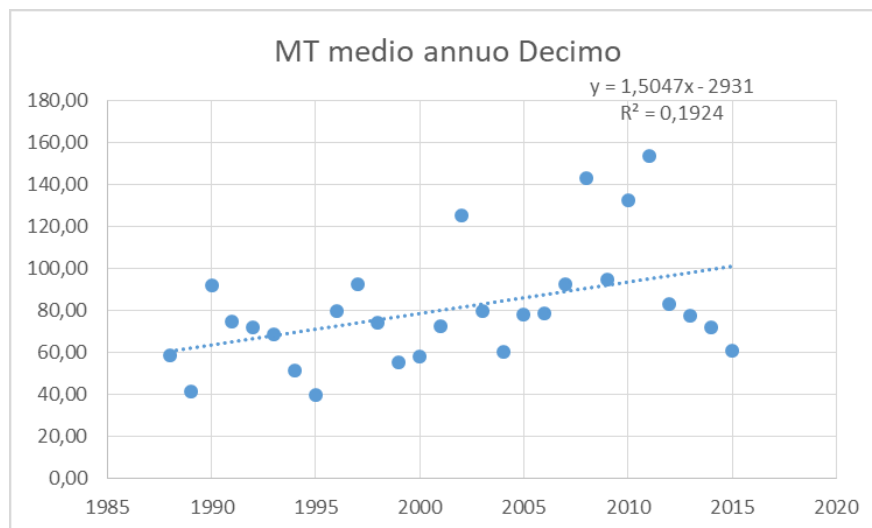


Grafico 29: stazione meteo di Decimomannu 1988-2017: regressione lineare dell'andamento dell'MT medio annuo.

La Regressione lineare effettuata sull'andamento dell'MT nella stazione meteo di Decimomannu 1988-2017 indica come ci sia stato un aumento di detto valore statisticamente significativo (P=0,01).

Elisabetta Pintore

"Fasciola hepatica in Sardegna: caratterizzazione fenotipica, valutazione dell'andamento climatico sulla stagionalità, trasmissione e diffusione della parassitosi"

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Sassari

Stazione Meteorologica di Olbia

1988	58,48
1989	59,93
1990	81,98
1991	85,53
1992	62,57
1993	60,12
1994	72,57
1995	78,58
1996	105,13
1997	65,76
1998	67,01
1999	65,29
2000	56,69
2001	68,37
2002	64,83
2003	79,81
2004	86,90
2005	67,24
2006	70,67
2007	99,24
2008	83,97
2009	89,07
2010	106,15
2011	94,12
2012	65,23
2013	96,95
2014	65,40
2015	74,81
2016	69,53
2017	61,93

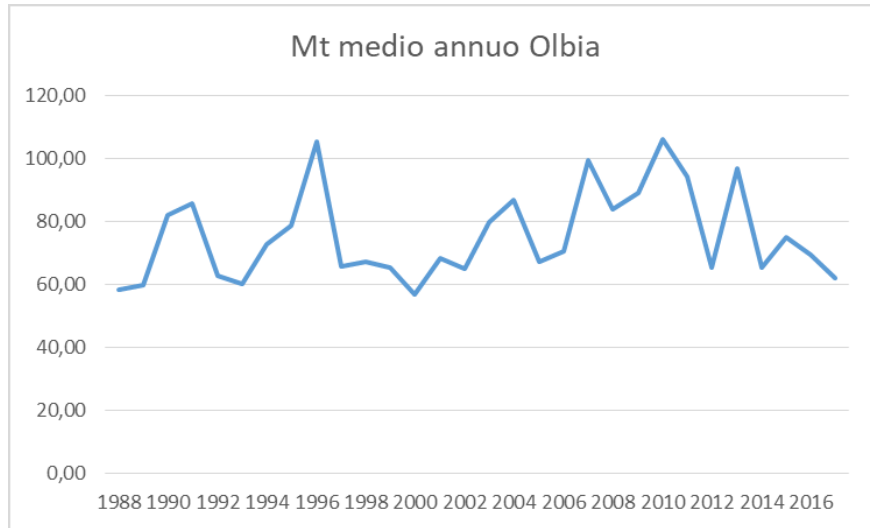


Grafico 30: andamento MT medio annuo 1988-2017 stazione di Capo Bellavista.

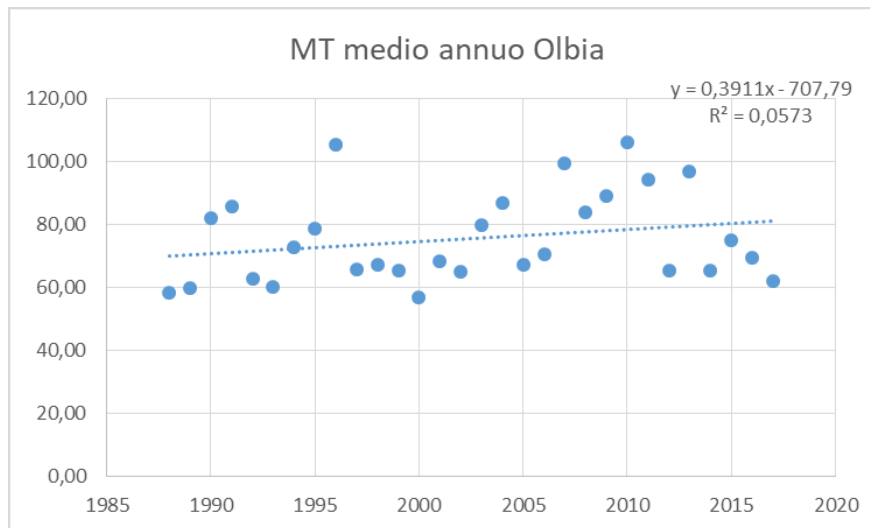


Grafico 31 : stazione meteo di Olbia 1988-2017: regressione lineare dell'andamento dell'MT medio annuo .

La regressione lineare effettuata sull'andamento dell'MT nella stazione meteo di Olbia (1988-2017) evidenzia come ci sia stato un aumento, seppur non statisticamente significativo, di detto valore ($p=0,20$).

Elisabetta Pintore

"Fasciola hepatica in Sardegna: caratterizzazione fenotipica, valutazione dell'andamento climatico sulla stagionalità, trasmissione e diffusione della parassitosi"

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Sassari

Stazione Meteo di Perdasdefogu

1988	63,69
1989	57,25
1990	59,77
1991	45,28
1992	97,84
1993	60,71
1994	83,85
1995	46,82
1996	87,12
1997	72,72
1998	55,76
1999	51,31
2004	60,49
2005	34,86
2006	55,23
2007	79,48
2008	50,49
2009	61,14
2011	58,45
2012	57,82
2013	77,36
2014	73,27
2015	79,71
2016	59,78
2017	82,44

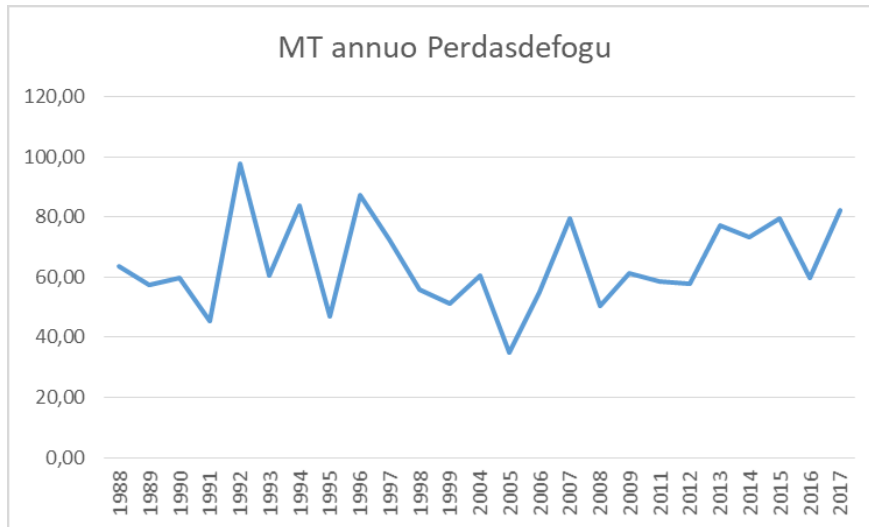


Grafico 32: andamento MT medio annuo 988-2017 stazione di Perdasdefogu

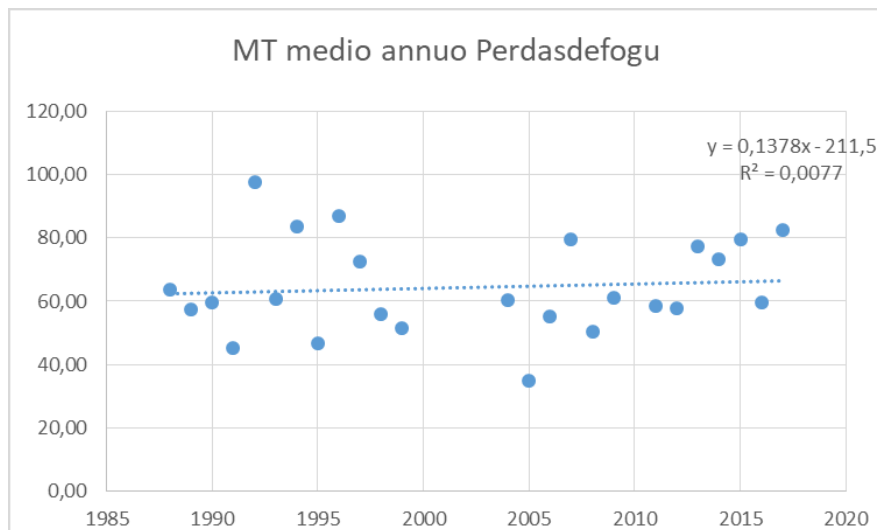


Grafico 33: stazione meteo di Perdasdefogu 1988-2017: regressione lineare dell'andamento dell'MT medio annuo

La regressione lineare effettuata sull'andamento dell'MT nella stazione meteo di Perdasdefogu (1988-2017) evidenzia come ci sia stato un aumento, seppur non statisticamente significativo, di detto valore ($P= 0,563$). Riassumendo, nonostante appaia evidente un aumento dell'MT medio annuo dal 1989 al 2017 in tutta la Sardegna, l'unica variazione statisticamente significativa si è registrata per la stazione meteorologica di Decimomannu.

Elisabetta Pintore

"Fasciola hepatica in Sardegna: caratterizzazione fenotipica, valutazione dell'andamento climatico sulla stagionalità, trasmissione e diffusione della parassitosi"

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Sassari

Discussione

La presente tesi di dottorato rappresenta il primo studio di caratterizzazione fenotipica effettuata mediante metodi standardizzati (Valero, 2005; Periago et al., 2008) condotto su *F. hepatica* della Sardegna e sulla correlazione tra la parassitosi e l'andamento climatico dell'isola negli ultimi 30 anni. Per la prima volta fasciole provenienti da una stessa specie ospite sono state comparate tramite la tecnica CIAS (Valero et al. 2005; Periago et al., 2006) i cui risultati dimostrano l'utilità di tale tecnica per la caratterizzazione fenotipica di fasciole adulte provenienti da un'area endemica.

La Sardegna, per la sua posizione centrale nel bacino del Mediterraneo, rappresenta un'area di notevole importanza per lo studio della trasmissione della fasciolosi e della sua evoluzione in tutta l'area Mediterraneo. Questo studio quindi ha importanza non soltanto per la regione stessa, quanto per chiarire maggiormente il quadro della situazione della parassitosi in Europa.

Studio fenotipico di *Fasciola hepatica* in Sardegna

In questo studio per la prima volta fasciole campionate in Sardegna sono state misurate e comparate con Fasciole standard, misurate in lavori precedenti, provenienti da altre nazioni.

F. hepatica negli ovini

Lo studio delle componenti principali tramite analisi multivariata (Grafico 1) mostra chiaramente le differenze morfometriche tra le popolazioni analizzate. L'asse delle X rappresenta la CP 1, indicatore di dimensioni del parassita (Bookstain, 1989), crescenti da sinistra verso destra mentre l'asse delle y è indicativo della "forma" del parassita. Si può notare come il gruppo di fasciole della Sardegna non si sovrapponga in alcun modo a quello Egiziano di *F. gigantica* standard, permettendo quindi di escludere la presenza in Sardegna di forme ibride. Inoltre, confrontando il gruppo di *F. hepatica* della Sardegna con i gruppi di *F. hepatica* standard presi in esame, il perimetro rappresentante i parassiti dell'isola permette di rilevare come quest'ultimo sia maggiormente spostato a destra rispetto agli altri ad esclusione di quelli egiziani. Ciò indica che le dimensioni massime riscontrate per le fasciole della Sardegna sono maggiori di quelle degli altri gruppi standard, con l'eccezione del gruppo *F. hepatica*

dell'Egitto con le quali si osserva sovrapposizione. Tali dimensioni non raggiungono comunque né tantomeno si sovrappongono con quelle del gruppo standard di *F. gigantea* egiziana.

Il grafico dei fattori canonici discriminanti, indipendente dall'effetto dalle dimensioni o ("size out"), e che rappresenta un'analisi discriminante della varianza tra gruppi noti che studia anche l'influenza della localizzazione geografica, (Grafico 2) e mostra come la massima distanza grafica rappresentata (varianza massima) sia quella tra le popolazioni *F. hepatica* dei diversi paesi e quella di *F. gigantea* dell'Egitto. Tali distanze sono descritte numericamente come distanze di Mahalanobis nella tabella 5. Pertanto i dati relativi alle dimensioni di *F. hepatica* non permettono di poterne discriminare l'origine geografica.

F. hepatica nei bovini

Lo studio delle componenti principali tramite analisi multivariata rappresentato nel Grafico 3, mostra chiaramente le differenze di morfologia e dimensioni tra le popolazioni analizzate. L'asse delle X rappresenta la CP 1, indicatore di dimensioni del parassita (Bookstain, 1989), crescenti da sinistra verso destra mentre l'asse delle y è indicativo della "forma" del parassita. Si nota come il gruppo di fasciole della Sardegna non si sovrapponga in alcun modo a quello standard di *F. gigantea* di Burkina Faso, escludendo quindi la presenza in Sardegna di forme ibride. Inoltre, confrontando il gruppo di *F. hepatica* della Sardegna con i gruppi di *F. hepatica* standard studiati per la specie bovina, il perimetro rappresentante i campioni dell'isola risulta sovrapposto agli altri perimetri. Ciò indica che le dimensioni massime e minime di *F. hepatica* della Sardegna rientrano tra quelle degli altri gruppi standard. Il grafico dei fattori canonici discriminanti, indipendente dall'effetto dalle dimensioni o ("size out"), che rappresenta un'analisi discriminante della varianza tra gruppi noti studiando anche l'influenza della localizzazione geografica, è riportato nel grafico 4 e mostra come la massima distanza grafica rappresentata (varianza massima) sia quella tra le popolazioni *F. hepatica* dei diversi Paesi e quella di *F. gigantea* del Burkina Faso. Relativamente alla Sardegna le distanze massime rilevate sono quelle con il Burkina Faso mentre quelle minime risultano essere con la Corsica. Tali distanze sono descritte numericamente come distanze di Mahalanobis (tabella 8).

Pertanto i dati fanno ipotizzare, relativamente alle dimensioni, una vicinanza fra *F. hepatica* della Sardegna e della Corsica.

Elisabetta Pintore

"*Fasciola hepatica* in Sardegna: caratterizzazione fenotipica, valutazione dell'andamento climatico sulla stagionalità, trasmissione e diffusione della parassitosi"

Studio della Climatologia

Lo studio della climatologia ha permesso di raggiungere tre obiettivi fondamentali per la ottimale comprensione della trasmissione della parassitosi e di valutare se:

1. la Sardegna sia una regione eterogenea o no dal punto di vista climatico;
2. sia presente una stagionalità nella trasmissione della parassitosi;
3. per ogni area geografica studiata i mutamenti climatici degli ultimi trent'anni abbiano avuto un impatto statisticamente significativo sul clima in Sardegna.

Studio della eterogeneità e della stagionalità

La comparazione dei climadiagrammi (Fuentes et al., 1999) atti a valutare omogeneità od eterogeneità climatica tra le diverse stazioni meteo ha confermato che l'isola appare climaticamente eterogenea come già ipotizzabile sulla base delle sue caratteristiche geopedologiche.

Temperature

Essendo la Sardegna una regione a clima mediterraneo, le temperature mensili medie minime registrate nel corso dei 30 anni raramente raggiungono livelli inferiori agli 0 °C (Tabella 1) il che indica che il ciclo vitale di *L. truncatula* mediamente possa continuare anche durante i mesi invernali, seppur non con temperature all'optimum (Williamson, 1978). La riproduttività dai gasteropodi si blocca completamente intorno agli 0°C, con la cosiddetta "ibernazione"(Roberts,1950; Kendall,1953; Hodasi,1976; Euzeby,1971). Ciò viene confermato anche da Arru e Papadopulos (1971) che rimarcano come le temperature seppur basse registrate nei mesi invernali in Sardegna, non uccidano le Lymneae ma ne blocchino la riproduzione tanto che, nei mesi favorevoli al loro sviluppo con temperature ottimali, siano presenti due generazioni differenti di molluschi: quelli giovani e quelli che hanno superato l'inverno. Gli stessi autori rilevavano come le nuove generazioni aumentassero fino a settembre. Ciò si discosta da quanto da noi riscontrato in base all'analisi dei climadiagrammi e dell'MT nella presente indagine che evidenzia come la stagionalità di trasmissione a si blocchi mediamente nei mesi di maggio-giugno per riprendere ad ottobre. Queste differenze possono far ipotizzare come dagli anni '70 ad oggi è possibile che si siano verificati cambiamenti nell'andamento climatico.

Elisabetta Pintore

"*Fasciola hepatica* in Sardegna: caratterizzazione fenotipica, valutazione dell'andamento climatico sulla stagionalità, trasmissione e diffusione della parassitosi"

Umidità

Anche l'umidità ha un andamento stagionale nell'isola. Essa si abbassa notevolmente durante la tarda primavera fino all'inizio dell'autunno (fine settembre-inizi di ottobre) insieme ad un calo delle precipitazioni ed al rialzo delle temperature (stagione secca). È durante il periodo nel quale il tasso di umidità inizia ad aumentare, insieme alle precipitazioni (e quindi al diminuire dell'evapotraspirazione) che prende piede la trasmissione di *F. hepatica*.

Evapotraspirazione

In Sardegna, nel periodo da maggio a settembre, si rileva un aumento dell'evapotraspirazione a seguito dell'aumento delle temperature medie, della diminuzione delle precipitazioni e dell'umidità relativa. Durante la stagione primaverile-estiva si assiste ad un prosciugamento della maggior parte degli invasi dell'isola creando così condizioni sfavorevoli per la prosecuzione del ciclo dei gasteropodi acquatici e per la trasmissione della parassitosi (Arru & Papadopulos, 1971).

In base all'analisi dei parametri sopradescritti si ritiene di poter confermare l'ipotesi che la Sardegna non sia omogenea da un punto di vista climatico. È possibile quindi che siano presenti fra le diverse aree dell'isola anche differenze nelle caratteristiche di trasmissione della patologia.

Stagionalità: Indice di previsione MT

I fattori climatici sono decisivi nella trasmissione di *F. hepatica*. L'incidenza annuale dell'infezione nell'ospite definitivo è stata correlata alla temperatura dell'aria alle precipitazioni e alla evapotraspirazione. Questi fattori influenzano la dinamica della popolazione dell'ospite intermedio, delle uova, delle sporocisti, delle redie cercarie e metacercarie. Potrebbe quindi essere possibile studiare indici climatici per prevedere l'incidenza della fasciolosi. Diversi sono già stati applicati con successo alla fasciolosi negli animali in produzione zootecnica (Fuentes et al., 1999) in varie aree d'Europa (Ollerenshaw, 1959- 1974; Ollerenshaw and Rowlands, 1959; Ollerenshaw & Smith, 1969; Ross, 1970-1978; Gettinby et al., 1974; Leim-bacher, 1978), Africa (Malone et al., 1998; Yilma and Malone, 1998) e Stati Uniti. (Malone et al., 1987; Malone & Zukowski, 1992).

Tra i quattro indici di previsione della fasciolosi più utilizzati, l'indice MT e l'indice del sistema basato sul bilancio idrico (Wb-bs) si rivelano essere i più utili in quanto sia l'indice "wet day" di Stormont

Elisabetta Pintore

"*Fasciola hepatica* in Sardegna: caratterizzazione fenotipica, valutazione dell'andamento climatico sulla stagionalità, trasmissione e diffusione della parassitosi"

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Sassari

(Ross, 1970) che il modello di temperatura (Gettinby et al., 1974) presentano dei limiti basandosi ciascuno su una sola variabile climatica.

Appurato il fatto che la Sardegna è climaticamente eterogenea, ciascuna stazione meteorologica è stata presa in esame per la valutazione del rischio di trasmissione basato sulla stagionalità attraverso il calcolo dell'MT medio Mensile nel corso dei ultimi trent'anni.

Secondo la relazione tra la curva dell'MT ottenuta per ciascuna stazione meteorologica e quelle di umidità, evapotraspirazione e precipitazioni dei climadiagrammi, si è potuto stabilire un valore limite di MT per la Sardegna di 60 oltre il quale aumenta l'incidenza di rischio di infestazione e al di sotto del quale il rischio può essere considerato nullo.

Esso scende sotto i 60 da maggio a settembre quando le temperature sono più alte, si hanno poche precipitazioni, più evapotraspirazione e meno umidità. Risulta evidente quindi che il periodo ottimale per la trasmissione è quello che va da ottobre ad aprile. Già i risultati ottenuti dall'esame dei climadiagrammi valutando le sole temperature hanno permesso di evidenziare orientativamente la presenza di stagionalità nella trasmissione della parassitosi. Soprattutto le stagioni che vanno da maggio a settembre presentano temperature massime troppo alte per permettere al mollusco di sopravvivere o comunque di compiere il suo ciclo vitale. L'optimum di temperatura per *L. truncatula* è appunto compreso fra i 20 e i 22 °C.

Cambiamento climatico

La capacità delle condizioni climatiche di modulare l'intensità e l'incidenza della parassitosi è ben nota da molto tempo. L'attuale cambiamento climatico, il cosiddetto "riscaldamento globale" sta influenzando ed influenzerà il tasso di distribuzione e di sopravvivenza degli ospiti intermedi e il tasso di riproduzione e di maturazione del parassita da essi veicolato (McCarthy, 2001). Qualsiasi influenza del clima sul parassitismo è potenzialmente importante per l'ecosistema e le comunità che vivono in natura. Studi recenti hanno enfatizzato la relazione esistente tra il cambiamento climatico e le malattie parassitarie e come vi sia l'emergenza e la riemergenza di numerose patologie (Harvell, et al., 1999;2002; Patz, 2000; Marcogliese, 2001; Lafferty, 2004). È evidente anche come il clima influisca nel sincronizzare i cicli delle popolazioni di ospiti influenzando direttamente la

Elisabetta Pintore

"*Fasciola hepatica* in Sardegna: caratterizzazione fenotipica, valutazione dell'andamento climatico sulla stagionalità, trasmissione e diffusione della parassitosi"

sopravvivenza e la trasmissione degli stadi intermedi dei parassiti (Cattadori, 2005). È fondamentale capire come i parassiti possano rispondere al cambiamento climatico nei prossimi anni in base ai risultati dei modelli di previsione meteo sia per l'interesse nei confronti della salute pubblica sia per preservare gli ecosistemi naturali. Nelle fasciole la temperatura ha un effetto diretto per una fase cruciale del loro ciclo, la produzione di cercarie nella loro fase all'interno dell'ospite intermedio (Kendall & McCullough, 1951; Dinnik, 1964; Boray, 1969; Ollerenshaw, 1971; Tang et al., 1979; Rim, 1982; Lo, 1996; Mouritsen & Poulin, 2002). La fuoriuscita della cercaria dal gasteropode è un'altra componente fondamentale per la riuscita del ciclo del trematode. (Erasmus, 1972; Galaktionov, 2003). Studi suggeriscono che la fuoriuscita della cercaria dal gasteropode non dipenda solamente dal metabolismo dell'ospite ma ci sono altri fattori che operano in sinergia per la liberazione delle cercarie stesse (Poulin, 2006). La temperatura gioca un ruolo fondamentale. La temperatura ideale si aggira intorno ai 20°C e viene dimostrato come a temperature crescenti il tasso di eliminazione delle cercarie si riduca drasticamente. La stretta dipendenza della fasciolosi dalle condizioni climatiche indica che il cambiamento climatico potrebbe avere una notevole influenza nell'evoluzione futura di tale patologia. Nell'uomo e negli animali, nelle Ande ad esempio, il riscaldamento globale ha subito un incremento generale nelle ultime decadi e pare avrà degli effetti sull'epidemiologia della parassitosi (Rosenz et al., 2007). Un futuro piccolo aumento della temperatura potrebbe portare a tassi di trasmissione e infestazione più elevati e modificare ulteriormente le attuali aree a basso, moderato e alto rischio individuate nell'area iperendemica mediante la mappatura climatica (Fuentes et al. 1999; 2001). Il riscaldamento globale è stato indicato come la causa dell'incremento della fascioliasi in UK (Mitchell, 2002; 2005; Pritchard, 2005.) e in Francia (Thomas, 2007). Tuttavia, il futuro scenario dell'area iperendemica della fasciolosi umana e animale del delta del Nilo (Esteban et al., 2003), appare più complicato a causa della combinazione di aumenti di temperatura e siccità, riduzione delle precipitazioni e conseguente stress idrico e impatto agricolo (Boko, 2007).

La situazione epidemiologica attuale dovuta ad una sovrapposizione degli agenti causali di *F. hepatica* e *gigantica* (Periago et al., 2008) potrebbe essere alterata a causa del cambiamento climatico che incide sia sullo sviluppo degli stadi larvali (Malone, 1998 ; Yilma & Malone, 1998) sia sulla

Elisabetta Pintore

"*Fasciola hepatica* in Sardegna: caratterizzazione fenotipica, valutazione dell'andamento climatico sulla stagionalità, trasmissione e diffusione della parassitosi"

sopravvivenza dell'ospite intermedio (Bargues et al., 2001). La fasciolosi sostenuta da *F. hepatica* è molto più collegata alla stagionalità rispetto a *F. gigantica* (Mas-Coma, 2004).

Per quanto riguarda la Sardegna la valutazione delle curve dell'andamento dell'MT annuale medio nel corso degli ultimi 30 anni ha permesso di valutarne la regressione lineare di tale andamento e la sua significatività statistica. Analizzando le 7 stazioni meteorologiche l'unica stazione meteorologica con una regressione lineare crescente statisticamente significativa è stata la stazione Meteo di Decimomannu. Questo dato potrebbe confermare tutti gli altri studi effettuati sul riscaldamento globale. Un incremento di MT sulla stazione di Decimomannu indica come, le temperature si siano notevolmente innalzate durante gli ultimi tre decenni e come le precipitazioni invece siano calate insieme a un incremento dell'evapotraspirazione e quindi dell'aridità. Ciò potrebbe spiegare come, durante le ultime ricerche effettuate per la seguente tesi, nella area corrispondente alla stazione meteo analizzata non siano stati presenti casi noti di fasciolosi animale.

Conclusioni

La presente tesi descrive per la prima volta:

- i risultati delle indagini sulla caratterizzazione fenotipica di fasciole adulte campionate da ovini e bovini in Sardegna attraverso un sistema di analisi delle immagini computerizzata (CIAS) sulla base di misurazioni standardizzate note per essere utili per la differenziazione di entrambe le specie;
- la comparazione delle fasciole della Sardegna con fasciole standard già studiate in lavori precedenti provenienti da altre aree europee ed extraeuropee;
- l'analisi dell'andamento climatico degli ultimi trent'anni al fine di valutare: l'omogeneità o eterogeneità climatologica nelle diverse aree dell'isola; l'esistenza di una stagionalità nella trasmissione di *F. hepatica*; la presenza di modificazioni climatiche che possano aver condizionato l'epidemiologia della parassitosi.

I dati ottenuti nella presente indagine evidenziano come in Sardegna si possa escludere la presenza sia di *F. gigantica* che di forme ibride e come l'unica specie presente sia *F. hepatica*.

Elisabetta Pintore

"*Fasciola hepatica* in Sardegna: caratterizzazione fenotipica, valutazione dell'andamento climatico sulla stagionalità, trasmissione e diffusione della parassitosi"

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Sassari

Tale analisi fenotipica si trova perfettamente in accordo con studi molecolari effettuati da Farjallah et al. nel 2009 che confermano l'esclusività di *F. hepatica* in Sardegna. Tuttavia, sono comunque in corso studi molecolari sui parassiti campionati nel corso della presente indagine e che consentiranno di confermare o meno i dati fenotipici ottenuti.

La Sardegna, come tutta l'area del bacino del Mediterraneo continua ad essere caratterizzata da una trasmissione della Fasciolosi bistagionale, presente nel periodo Ottobre-Aprile con un picco intorno ai mesi di marzo-aprile. Nei mesi estivi, le elevate temperature ed evapotraspirazione, insieme ad un calo delle precipitazioni e dell'umidità non permettono invece all'ospite intermedio di poter proseguire il suo ciclo vitale e quindi di favorire la trasmissione della patologia. La valutazione dell'indice di previsione climatica MT rappresenta un primo dato che consente di stabilire come anche la Sardegna probabilmente non sia esente dal fenomeno del cambiamento climatico particolarmente manifesto nell'area sud occidentale della Sardegna.

Bibliografia

- Andrews, A., 1999. The life cycle of *F. hepatica*. J,P Dalton (Ed.) Fasciolosis, CABI, Oxon, 1-29.
- Armour, J., 1975. The epidemiology and control of bovine fascioliasis. *Vet. Rec.*, 96, 198-201.
- Arru, E., 1976. Profilassi deparassitosi degli ovini e dei caprini in Sardegna. Atti del primo Convegno Nazionale della Società Italiana di Patologia e d'Allevamento degli Ovini e dei Caprini. Catania .
- Arru, E., Garippa G., 1990. Diffusione della distomatosi epatica negli ovini della Sardegna. *Atti SiSVet*, (p. 1263).
- Arru, E., Cosseddu, Tarantini, Leoni ,1980. Atti X congresso Nazionale Società Italiana Parassitologia.
- Arru, E., Papadopulos, I., 1971. Gli ospiti intermedi di alcuni fra i più comuni trematodi della Sardegna con particolare riguardo a *Fasciola epatica*- sistemi di lotta. *Veterinaria Italiana*, rivista di igiene profilassi e terapia XXII, 151-190.
- Arru, E., Deiana, S., 1970. Azione del Rafoxanide (3,5-diiodo-3cloro-4(clorofenossi)-salicilanide nella distomatosi da *F. hepatica* dei bovini. *Atti della Società italiana di Scienze Veterinarie*, (p. Volume XXIV).
- Arru E., Deiana S., Nuvole A., 1967. Distomatosi epatica nei leporidi selvatici in Sardegna. Convegno della Società Italiana delle Scienze Veterinarie . Senigallia 21-24 settembre .
- Arru E. , Mura, 1969. Sulla distomatosi da *Fasciola hepatica* in Sardegna. In *Vet Ital* vol 20 (pp. 521-539).
- Bargues, M.D., Vigo, M., Dvorak, J., Patzner, R.A., Pointier, J.P., Mas-Coma, S., 2001. European Lymnaeidae (Mollusca: Gasteropoda) intermediate hosts of trematodes, based on nuclear ribosomal DNA ITS-2 sequences. *Infect. Genet. Evol.*, 1, 85-107.
- Bargues, M.D., Artigas, P., Khoubbane, M., Ortiz, P., Naquira, C., Mas-Coma, S., 2012. Molecular characterisation of *Galba truncatula*, *Lymnaea neotropica* and *L. schirazensis* from Cajamarca, Peru and their potential role in transmission of human and animal fascioliasis. *Parasit Vectors*. 5, 174.
- Bargues, M.D., Gayo, V., Sanchis, J., Artigas, P., Khoubbane, M., Birriel, S., Mas-Coma, S., 2017. DNA multigene characterization of *Fasciola Hepatica* and *Lymnaea neotropica* and its

Elisabetta Pintore

"*Fasciola hepatica* in Sardegna: caratterizzazione fenotipica, valutazione dell'andamento climatico sulla stagionalità, trasmissione e diffusione della parassitosi"

fascioliasis transmission capacity in Uruguay, with historical correlation, human report review and infection risk analysis. *Neglected Tropical Diseases* 11.

- Bargues, M.D., Artigas, P., Khoubbane, M., Mas-Coma, S., 2011. DNA sequence characterization and phylogeography of *Lymnaea cousini* and related species, vectors of fascioliasis in Northern Andean countries with description of *L. meridensis* n. sp. (Gastropoda: lymnaeidae). *Parasites & Vectors*, 4 : 132-154.
- Bargues, M. D., Artigas, P., Kohunbbane, M., Flores, R., Gloer, P., Garcia, R. R., Mas-coma, S., 2011. *Lymnaea schirazensis*, an overlooked snail distorting fascioliasis data: genotype, phenotype, Ecology, worldwide spread, susceptibility, applicability. *PLoS ONE* 6 e 24567, 33p.
- Bargues, M. D., Artigas, P., Mera, Y. S., Pointier, J. P., Mas-Coma, S., 2007. Characterization of *Lymnaea cubensis*, *L. viatrix* and *L. neotropica* n. sp., the main vectors of *Fasciola hepatica* in Latin America by analysis of their ribosomal and mitochondrial DNA. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 101: 621-641.
- Beesley et al. ,2017. *Fasciola* and Fascioliasis in ruminants in Europe: Identifying research needs. *Transbound Emerg. disease* 65 suppl. 1, 199-216.
- Boko, M., Niang, I., Nyong, A., Vogel, C., Githeko, A., Medany, M., Osman- Elasha, B., Tabo, R., Yanda, P., 2007. Africa. In: Parry, M.L., Canziani, O.F., Palutikof, J.P., van der Linden, P.J., Hanson, C.E.. *Climate Change 2007: Impacts, Adaptation and Vulnerability. Contribution of Working Group II to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Bookstain, 1989. Size and shape: a comment on semantics. *Syst. Zool.* 38, 173-180.
- Boray, J.C., 1969. Experimental fascioliasis in Australia. *Adv. Parasitol.* 7,.
- Boray, J.C., 1983. treatment of immature and mature *Fasciola hepatica* infections in sheep with triclabendazole. *Veterinary Record.* 113, 315-317.
- Carta, A., 1932. Le alterazioni delle linfoghiandole periportalì nella distomatosi epatica. *La Nuova Veterinaria* .
- Cattadori I., Haydon D.t , Hudson T.J., 2005. Parasites and climate synchronize red grouse populations. *Nature* , 433, 737-741.
- Cawdery, M. J., Gettinby, G., Grainger, J. N., 1978. Mathematical models for predicting the prevalence of liver fluke disease and its control from biological and methodological data. *Weather and Parasitic Animal Disease. World Methodological Organization Technical*, 159: 21-38.

Elisabetta Pintore

“*Fasciola hepatica* in Sardegna: caratterizzazione fenotipica, valutazione dell’andamento climatico sulla stagionalità, trasmissione e diffusione della parassitosi”

- Chen M.G., Mott, K.E., ,1990. Progress in assesment of morbidity due to Fasciola hepatica infection: a review of recent literature). Tropical Diseases Bull, 87, R1-R38.
- Coluzzi, A., Nuvole, A., Orecchia, P., Paggi, L. ,1965. Indagini su Bulinus truncatus e Schistosoma bovis della Sardegna. Parassitologia,7, 173.
- Cwiklinski, K., Dalton, J. P., Dufrense, Coirse, J., Williams, D. J., Hodgkinson, J., Paterson, S., 2005. The fasciola hepatica genome: gene duplication and polymorphism reveals adaptation to the host enviroment and the capacity for rapid evolution. Genome Biology ,16, 71.
- Dawes,B., Huges,D.L., 1964. Fascioliasis: The invasive stage of Fasciola hepatica in mammalian. Adv. Parasitol. 2, 97-168.
- Dinnik, J. D.,1964. The influence of temperature on the succession of redial and cercarial generations of Fasciola gigantica in a snail host. Parasitology , 54, 59–65.
- Dujardin,J.P., 2008. Morphometrics applied to medical entomology. Infect Genet Evol, 875-890.
- Dujardin,J.P., Pont, L., 2004. Geographical variation of metric properties within the neotropical sendflies. Infect.Genet.Evol, 875-890.
- Dujardin, J. P., 2002. BAC Software. Institute de Reserches pour la Developement(IRD France).
- Erasmus, D., 1972. The Biology of Trematodes. London: Edward Arnold publ.
- Esteban, J.G. ,Gonzalez, C., Curtale, F., Muñoz-Antoli, C., Valero, M.A., Bargues, M.D.,el-Sayed, M., el-Wakeel, A.A., Abdel-Wahab, Y., Montresor, A., Engels, D., Savioli, L., Mas-Coma, S., 2003. Hyperendemic fascioliasis associated with schistosomiasis. Am. J. Trop. Med. Hyg. , 69, 429–437.
- Fairweather, I., Threagold, L., Hanna, R., 1999. Development of Fasciola hepatica in the mammalian host. Fascioliasis CAB International, 47-111.
- Farjallah, S., Sanna, D., Amor, N., Ben Mehel, B., Piras, M.C., Merella, P., Casu, M., Curini-Galletti, M., Said, K., Garippa, G., 2009. Genetic characterization of Fasciola hepatica from Tunisia and Algeria based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. Parasitol. Res. 105, 1617–1621.
- Fromming, E., 1956. Biologie der mitteleuropaischen Susswasserschnecken, . Duncker & Humblot, Berlin, 120-129.
- Fuentes, M. V., Valero, M. A., Bargues, M. D., Esteban, J. G., 1999. Analysis of climatic data and forecast indices for human fascioliasis at very high altitudes. Annals of Tropical Medicine and Parasitology.

Elisabetta Pintore

“*Fasciola hepatica* in Sardegna: caratterizzazione fenotipica, valutazione dell’andamento climatico sulla stagionalità, trasmissione e diffusione della parassitosi”

- Galaktionov, K.V., Dobrovolskij, A., 2003. *The Biology and Evolution of Trematodes*. . Dordrecht, The Nether-lands.: Kluwer Academic Publishers,.
- Giovannola, A., 1938. Osservazioni sui gasteropodi della Sardegna di importanza medica e veterinaria. *Ri. Paassit.* 2, 111-120.
- Hargreaves, G. H., Samani, Z. A., 1985. Reference crop evapotranspiration from temperature. *Applied Eng. in Agric.*, 1(2): 96-99.
- Harvell, C. D., Kim, K., Burkholder, J. M., Colwell, R., Epstein, P. R., Grimees, D. J., et al., 1999. Emerging marine dis- eases: climate links and anthropogenic factors. *Science*, 285, 1505–1510.
- Harvell, C. D., Mitchell, C. E., Ward, J. R., Altizer, S., Dobson, A., Ostfeld, R. S., & al., 2002. Climate warming and disease risks for terrestrial and marine biota. *Science*, 296: 2158-2162.
- Harvell, C. M., 2002. Climate warming and disease risk for terrestrial and marine biota. *Science*, 296, 2158–2162.
- Haseeb, A. N., Shazly, A. M., Arafa, M. A., & Morsy, A. T., 2002. A review on Fascioliasis in Egypt. *Journal of the Egyptian Societ of Parasitology*, 32: 317-354.
- Kelley, J. M., Elliot, T. P., Beddoe, T., Anderson, G., Skuce, P., & Spithill, T. W., 2016. Current treat of triclabendazole resistance in *Fasciola hepatica*. *Terends in parasitology*, 32, 458-469.
- Kendall, S. B., & McCullogh, F. S., 1951. The emergence of the ceracrie of *Fasciola hepatica* from the snail *Limnaea Truncatula*. *J. of Helmint.* 25, 77-92.
- Khallaayoune, K. S., 1990. Effects of constant and cycling temperatures on survival and development of eggs of *Lymnaea truncatula* MuÈ ller. *Actes de l’Institut Agronomique et VeÂteÂrinaire Hassan II*, 10, 13-17.
- Lafferty, K.D, Porter, J.W., Ford, S.E., 2004. Are diseases increasing in the ocean? *Ann. Rev. Ecol. Evol. Syst*, 35, 31–54.
- Lo, C.T, Lee, K. M., 1996. Pattern of emergence and the effects of tempera- ture and light on the emergence and survival of heterophyid cercariae (*Centrocestus formosanus* and *Haplorchis pumilio*). . *J. Parasitol.*, 82, 347– 350.
- Mage, C., Bourgne, H., Toulieu, J.M., Rondelaud, D., Dreyfuss, G., 2002. *Fasciola Hepatica* and *Paramphistomum daubneyi*: changes in prevalences of natural infections in cattle and *Lymnaea truncatula* from central France over the past 12 years. *Vet.Res.*, 33, 439-447.
- Mahalanobis, 1936. On the generalized distances in statistic. *Proceeding of The National Institute of Science of India* Vol. 2 num 1, 49-55.

Elisabetta Pintore

“*Fasciola hepatica* in Sardegna: caratterizzazione fenotipica, valutazione dell’andamento climatico sulla stagionalità, trasmissione e diffusione della parassitosi”

- Malone, J. B., Williams, T. E., Muller, R. A., Geaghan, J. P., & Loyacano, A. F. (1987). Fascioliasis in cattle in Louisiana: development of a system to predict disease risk by climate, using the Thornthwaite water budget. *Am. J. Vet. Res.*, 48, 1167-1170.
- Malone, J. G., 1998. A geographic information system on the potential distribution and abundance of *Fasciola hepatica* and *F. gigantica* in east Africa based on Food and Agriculture Organization databases. *Vet. Parasitol.*, 78, 87–101.
- Marcogliese, D., 2001. Implications of climate change for parasitism of animals in the aquatic environment. *Can. J. Zool.*, 79, 1331–1352.
- Marcos, 1993. Ontogenia del adulto de *Fasciola hepatica* (Linnaeus 1758) (Trematoda: fasciolidae) en infestaciones experimentales de macromamíferos y micromamíferos continentales e insulares. Valencia, SPagna: Universidad de Valencia.
- Mas-Coma, S., et al., 2001. *Fasciola hepatica* and lymnaeid snails occurring at very high altitude in South America. *Parasitology*; 123, S115–S127.
- Mas-Coma, S., Valero, M.A., 2009. *Fasciola*, lymnaeids and human fascioliasis, with a global overview on disease transmission, epidemiology, evolutionary genetics, molecular epidemiology and control. *Adv Parasitol.* 69, 41-146.
- Mas-Coma S., Valero, M.A., Bargues, M.D., 2009. *Fasciola*, lymnaeids and human fascioliasis, with a global overview on disease transmission, epidemiology, evolutionary genetics, molecular epidemiology and control. *Adv. Parasitol*, 69, 41-146.
- Mas-Coma, S., Bargues, M.D., 1997. Human liver flukes: a review. *Res.Rev. Parasitol.*, 57, 145-218.
- Mas-Coma, S., 2008. The worldwide initiative against human fascioliasis. In: Special Issue.
- Mas-Coma, S., 2005. Epidemiology of fascioliasis in human endemic areas. *J. Helminthol.* 79,.
- Mas-Coma, S., (2008). The worldwide initiative against human fascioliasis. In: Special Issue for the 3rd Symposium on Flukes and Schistosomes EMOP 10 *J. Helminthol.*
- Mas-Coma, S., Angles, Esteban, A., 1999. The Northern Bolivia Altiplano: a region highly endemic of Human Fascioliasis. *Tropical Medicine & International Health*, 4, 454-467.
- MAS-Coma S. Rodriguez A, Bargues M D, Valero M A, Coello J R, Angles R. (1997). Secondary reservoir role of domestic animals other than sheep and cattle in fascioliasis transmission in the northern Bolivian Altiplano. *Research and Reviews in Parasitology*, 57, 39±46.

Elisabetta Pintore

“*Fasciola hepatica* in Sardegna: caratterizzazione fenotipica, valutazione dell’andamento climatico sulla stagionalità, trasmissione e diffusione della parassitosi”

- Mas-Coma, S., Rodriguez, A., Bargues, M.D., Valero, M.A., Coello, J., Angles, R., 1997. Secondary reservoir roles of domestic animals other than sheep and cattle in fascioliasis transmission in the Northern Bolivian Altiplano. *Research and Review in Parasitology*, 57, 39-46.
- Mas-Coma, S., Valero, M. A., Bargues, M. D., 2009. Climate change effects on trematodiasis with emphasis on zoonotic fascioliasis and schistosomiasis. *Veterinary Parasitology* 163, 264-280.
- Mas-Coma, S., Valero, M. A., Bargues, M. D., 2014. Fascioliasis. In T. & Fried, *Digenetic Trematodes, Advances in Experimental Medicine and Biology* (pp. 77-114). Toledo.
- McCarthy, J. C., 2001. Climate change 2001: impacts, adaptation and vulnerability. (I. In Contribution of Working Group II to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel of Climate Change (IPCC). Cambridge: Cambridge University Press,.
- Mera y Sierra, R., Artigas, P., Cuervo, P., Deis, E., Sidoti, L., Mas-Coma, S., et al., 2009. Fascioliasis transmission by *Lymnaea neotropica* confirmed by nuclear rDNA and mtDNA sequencing in Argentina. *Vet Parasitol.* 166: 73–79.
- Mitchell, G., 2002. Update on fascioliasis in cattle and sheep. *Pract*, 24, 378–385.
- Mitchell, G. S., 2005. Effects of Climate Change on Helminth Diseases in Scotland. SAC Veterinary Centre Auchincruive, Ayr, , pp. 1–11.
- Mouritsen, K. N., Poulin, R., 2002. Parasitism, climate oscillations and the structure of natural communities. *Oikos* 97, 462–468.
- Mura, D., Arru, E., 1968. Some original observations on the life cycle of *F. hepatica* in Sardinia. *Studi Sassaresi Fasc* 5-6.
- Nice, N. W. , 1974. A study of the effect of the temperature on the growth of *Fasciola hepatica* in *Lymnaea truncatula*. *Parasitology* , 68, 47–56.
- Ollerenshaw, C.B., 1971. The influence of climate on the life cycle of *Fasciola hepatica* in Britain with some observations on the relationship between climate and the incidence of fascioliasis in the Netherlands. Facts and reflections symposium proceeding (3 June 1971), Parasitology Department of the Centraal Diergeneeskundig Instituut, Lelystad, pp. 41-63.
- Ollerenshaw, C.B. ,1973. A comment on the epidemiology of *Fasciola hepatica* in Italy. *Ann Fac Med Vet* 20, 83-121.
- Ollerenshaw, C.B., 1974. Forecasting liver-fluke disease. . In M. R. Taylor AR, In: *The effects of meteorological factors upon parasites, symposium of the British Society for Parasitology.* . (pp. 33-52 pp). Oxford,: Blackwell Scientific Publications.
- Ollerenshaw, C. B., 1959. The ecology of the liver fluke (*F. hepatica*). *Vet.Rec.*71, 957-965.

Elisabetta Pintore

“*Fasciola hepatica* in Sardegna: caratterizzazione fenotipica, valutazione dell’andamento climatico sulla stagionalità, trasmissione e diffusione della parassitosi”

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Sassari

77

- Ollerenshaw, C. B., 1973. A comment on the epidemiology of *Fasciola hepatica* in Italy. *Ann Fac Med Vet* 20,, 83-121.
- Ollerenshaw, C. B., & Smith, L. P., 1969. Meteorological factors and forecasts of helminthic disease. *Adv. Parasitol.*, 7, 283-323.
- Ollerenshaw, C. B., Rowlands, W. T. ,1959. A method of forecasting incidence of fascioliasis in Anglesey. *Ver.Rec.*,71, 591-598.
- Oviedo,J.A., Bargues, M.D., .Mas-Coma, S., 1996. The intermediate snail host of *Fasciola*. *Res. Rev. Parasitol.* 56,, 217-220.
- Panova, M., 2002. Analisis morfometrico de los estadios de adulto y huevo de especies de *Fasciola*(Linnaeus1758) (trematoda:Fasciolidae). Valencia: Univesidad de Valencia.
- Patz, J. G., 2000. Effect of environmental change on emerging parasitic diseases. . *Int. J. Parasitol.*, 30, 1395–1405.
- Pegreff, G., 1955. *Bull. Off. Int. Epizoot.*
- Periago, M. V., Valero, M. A., El-Sayed, M., Ashrafi, K., El-Wakeel, A., Mohamed, M. Y., Mas-Coma, S.,2008. First phenotypic description of *Fasciola hepatica/fasciola gigantica* intermediate forms from the human endemic area of the Nile Delta,Egypt. *Infections, Genetics and Eevolution*,8, 51-58.
- Periago, M.V., Valero, M.A., Mas-Coma, S., 2006. Phenotypic comparison of allopatric populations of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* from european adn african bovine using a computer image analysisi system (CIAS). *Psrasitology Research* 99, 368-378.
- Petzold, F., 1989. Populationsdynamik von *Galba truncatula*und deren infektion mit *Fasciola hepatica* in einem endemischen Voralpengebiet der Schweiz. University of Basel.
- Pexioto,R.V., 2016. Fenotipaje de individuos del genero *Fasciola* Linnaeus,1758 (Trematoda:Fasciolidae) de areas endemicas con características epidemiologicas heterogeneus. Valencia: Universidad de Valencia Facultad de Farmacia.
- Pitman, C. L., 1993. Fragmentation of Gondwana: The separation of Africa and South America. In Goldblatt, *Biological relationships between Africa and South America* (pp. 15-37). New Haven: Yale University Press.
- Poglayen G., Capelle, G., Martini, M., Zampiccolli, R. G., 1995. Epidemiologie della parassitosi dell'apparato digerente della provincia autonoma di Trento. *Atti societ  italiana di Buiatria*, 27, 483-489.

Elisabetta Pintore

“*Fasciola hepatica* in Sardegna: caratterizzazione fenotipica, valutazione dell’andamento climatico sulla stagionalit , trasmissione e diffusione della parassitosi”

- Poulin, R., 2006. Global warming and temperature-mediated increases in cercarial emergence in trematode parasites. *Parasitology*, 132, 143–151.
- Pritchard, G.C., Forbes, A.B., Williams, D.J.L., Salimi-Bejestami, M.R., Daniel, R.G., 2005. Emergence of fasciolosis in cattle in East Anglia. *Vet. Rec.*, 157, 578–582.
- Quiroz., 2000. *Parasitologia t enfermedades parasitarias de animales domesticos*. Mexico.
- Rapsh, C., 2008. An interactive map to assess the potential spread of *Limnaea truncatula* and the free-living stages of *Fasciola hepatica* in Switzerland. *Veterinary Parasitology* 3-4, 242-249.
- Reis, Pessoa, Strauss., 1990. Application of free Canonical Discriminant Analysis to Studies of Geographical Differentiation. *Rev. Brasil. Genet.* 13, 3, 509-520.
- Roberts, E. W., 1950. Studies on the life-cycle of *Fasciola hepatica* (Linnaeus) and of its snail host, *Limnaea (Galba) truncatula* (Müller), in the field and under controlled conditions in the laboratory. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 44, 187±206.
- Rohlf, Marcus. 1993. A revolution in morphometrics. *Trends Ecol. Evol.* 8, 129-132.
- Ross, J., 1970. The Stormont "wet day" forecasting system for fascioliasis. *Br. Vet.J.*, 126, 401-408.
- Rowcliffe, S. A., Ollerenshaw, C. B., 1960. Observations on the bionomics of the egg of *Fasciola hepatica*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 54: 172-181.
- Samani, Z., 2000. Estimating Solar Radiation and Evapotranspiration Using minimal climatological data. *Journal of irrigation and drainage engineering* vol 126 no 4, 265-267.
- Scala, A., Cancedda, M., 1993. La fascioliasi nei cavallini della Gara (Sardegna): aspetti parassitologici e anatomo-topatologici. *Atti Società Italiana delle Scienze Veterinarie parte II -comunicazioni scientifiche*, (pp. 1395-1399). Riccione.
- Scala, A., Pintori, A., Uras, P., Garippa, G., 2002. Aggiornamenti sull'epidemiologia delle distomatosi epatiche degli ovini in Sardegna. *XV Congresso Nazionale Sipaoc*, (p. 96). Cagliari.
- Tanda, S., Arru, E., 1963. Sul problema della distomatosi epatica dei bovini e degli ovini in Sardegna. *Studi Sassaesi* Vol. XLI.
- Tanda, S., Arru, E., 1969. Sulla distomatosi da *Fasciola hepatica* in Sardegna. "Veterinaria Italiana" *Rivista di Igiene profilassi e terapia*, 521-549.
- Taylor, M. A., Coop, R. L., Wall, R. L., 2010. *Parassitologia e malattie parassitarie degli animali*. Prima Edizione Italiana, EMSI.
- Taylor, S., 1989. Control of Fasciolosis in the British Isles. In *Magy Allartorv Lapja* Volume 44 (pp. 651-655).

Elisabetta Pintore

"*Fasciola hepatica* in Sardegna: caratterizzazione fenotipica, valutazione dell'andamento climatico sulla stagionalità, trasmissione e diffusione della parassitosi"

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Sassari

- Thomas, A., 1883. The life history of the liver-fluke (*Fasciola hepatica*). *Quart. j. Microsc. Sci.*, 99-133.
- Thomas, A. P., 1883. The life story of the liver fluke (*Fasciola hepatica*). *Quart J Mic Sci*, 23: 99-123.
- Thomas, C. J., 2007. La prevalence des helminthoses bovines a-t-elle ete' modifie' e par la canicule de l'e'te' 2003 dans le Sud-Ouest de la France. *Parasite*, 14, 265-268.
- Urquhart, G., Armour, J., 2001. *Parasitologia Veterinaria*. Zaragoza.
- Valero, M. A., 1986. Revision sistematica de la familia de Brachylaimidae Joux et Foley, 1930 (Trematoda: Digenea; Brachylaimoidea) con aportaciones al conocimiento de la variabilidad intraspecifica de los adultos de sus especies representantes. *Tesi Doctoral, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia*, 980 pp.
- Valero, M. A., Mas-Coma, S., 1985. consideraciones metodologicas sobre la aplicacion de la tecnicas estadisticas en parasitologia. *IV Congreso Nacional de Parasitologia, Resumen de las comunicaciones*, 155.
- Valero, M. A., Marcos, M. D., Mas-Coma, S., 1996. A mathematical model for the ontogeny of *Fasciola hepatica* in definitive host. *Research and Review in Parasitology*, 125-128.
- Valero, M. A., Panova, M., Mas-Coma, S., 2001. Development differences in the uterus of *Fasciola hepatica* between livestock liver fluke population of Bolivian highland and European lowlands. *Parasitology Research* 87:, 337-342.
- Valero, M. A., Panova, M., Mas-Coma, S., 2005. Phenotypic analysis of adults and eggs of *Fasciola hepatica* by computer image analysis system. *Journal of Parasitology*, 79: 217-225.
- Valero, M. A., Panova, M., Comes, A. M., Fons, R., Mas-Coma, S., 2002. Patterns in size egg shedding of *Fasciola hepatica* eggs by naturally and experimentally infected murine rodents. *Journal of Parasitology*, 88: 308-313.
- Valero, M. A., Perez-Crespo, I., Khoubbane, M., Mas-Coma, S., 2009. Fluke egg characteristics for the diagnosis of human and animal fascioliasis by *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*. *Acta Tropica*, 111: 150-159.
- Valero, M. A., Renzi, M. D., Mas-Coma, S., 1987. propuesta de una metodologia para el estudio de las trayectorias ontogenica de los Digenidos adultos de la familia Brachylaimidae Joux & Foley 1930. *V Cong. Nac. Parasitol. Resumenes de las comunicaciones*, (pp. 21-22). Salamanca.
- Valero, M. A., Panova, M., Mas-Coma, S., 2005. Phenotypical analysis of adults and eggs of *Fasciola hepatica* by computer image analysis system. *J. Helminthology* 79, 217-225.

Elisabetta Pintore

"*Fasciola hepatica* in Sardegna: caratterizzazione fenotipica, valutazione dell'andamento climatico sulla stagionalità, trasmissione e diffusione della parassitosi"

- Valero, M. .A , Periago M., Perez-Crespo, I., Khoubbane, M., Mas-Coma, S.,2011. Correlation between egg shedding and uterus development in *Fasciola hepatica* human and animals isolates: applied implications. *Veterinary Parasitology*, 183, 79-86.
- Williamson, W., 1978 . The use of mathematical models for predicting the incidence of fascioliasis. Gibson T.E(Ed.)*Weather and parasitic animal disease*.World Meteorogilal Organization,Technical Note 159, 39-47.
- Wilson, R. A., 1969. Fine structure of the tegument of the miracidium of *Fasciola hepatica*. *L. Journal of Parasitology*, 55: 124-133.
- Yilma, J.M., Malone J. B., 1998. A geographic information system forecast model for strategic control of fascioliasis in Ethiopia. *Vet. Parasitol.* , 78, 103–127.
- Zilch, A., 1959. *Gastropoda (Euthyneura)*. In Schindewolf, *Handbuch der Paleozoologie*, vol. 6, (pp. 91–102.). Berlin: Schindewolf.