**Titolo Assegno di ricerca:**

Influenza del management e della alimentazione sulle infezioni da Apicomplexa intestinali nell'allevamento bovino

**Introduzione**

Le malattie parassitarie sostenute da protozoi parassiti intracellulari del phylum Apicomplexa (es. coccidiosi da *Eimeria*, *Isospora* e *Cystoisospora*, cryptosporidiosi da *Cryptosporidium*, infezioni da coccidi formanti cisti quali *Neospora*, *Besnoitia*, *Sarcocystis* e *Toxoplasma*) possono interessare un’ampia varietà di vertebrati.

In particolare, le coccidiosi da *Eimeria* spp. sono comuni nei bovini, compromettendo la salute, il benessere e la produzione di questi animali, soprattutto in giovane età [1]. La gravità dell'infezione è correlata alla specie di *Eimeria*, all'età degli animali, allo stato immunologico degli ospiti, alla dose di oocisti ingerita, a fattori ambientali e alla gestione dell'allevamento [2-4], che può comportare l’ingestione di un elevato numero di oocisti sporulate (forma infettante di questi protozoi) assieme a mangimi, acqua o pascoli contaminati o in seguito a leccamento del pelo contaminato. Le coccidiosi possono causare perdite economiche significative in quanto possono determinare, oltre a malattia e in certi casi la morte degli animali, una riduzione delle prestazioni zootecniche, predisporre il bestiame a infezioni batteriche e virali secondarie, aumentare la domanda di manodopera per la cura e il trattamento del bestiame infetto e i costi dei farmaci. Trattamenti metafilattici con toltrazuril nel periodo di prepatenza o entro 24 ore dall'insorgenza di fenomeni diarroici, sono molto utili contro le infezioni da *Eimeria* nei bovini [5-7], migliorando le prestazioni negli animali (es. aumento più rapido del peso corporeo, influenza positiva sull'età media al primo parto, aumento della percentuale complessiva di gravidanze). Inoltre, è stata dimostrata una correlazione del trattamento con la riduzione dell'escrezione di oocisti, con conseguente diminuzione della contaminazione ambientale, con particolare riferimento alle due specie ritenute le principali responsabili della coccidiosi clinica, *E. zuernii* ed *E. bovis*. [5]. Al contrario, il trattamento della coccidiosi già in fase clinica è considerato inefficiente a causa dell'esteso danno intestinale già causato dall'infezione [8,9]. Inoltre diverse pubblicazioni scientifiche di ricercatori norvegesi hanno dimostrato la possibilità di comparsa di farmacoresistenza al Toltrazuril nelle specie di *Eimeria* delle pecore [10].

Anche per quanto concerne un’altra malattia da apicomplexa frequente nei vitelli, quale la cryptosporidiosi, le oocisti di *Cryptosporidium* spp. vengono trasmesse per via oro-fecale, sia direttamente attraverso il contatto con le feci, sia con cibo o acqua. Gli animali neonati infetti da *C. parvum*, specie peraltro di elevata importanza zoonotica, possono presentare abbondante diarrea acquosa che di solito si verifica 3-4 giorni dopo l'ingestione delle oocisti, inappetenza, letargia, disidratazione e in alcuni casi con esito fatale. L’emissione di oocisti non è sempre associata alla diarrea, ma i vitelli infetti possono rilasciare ogni giorno un gran numero (oltre 1 × 1010) di oocisti, che sono immediatamente infettanti per altri ospiti suscettibili, nei quali sono necessarie pochissime oocisti di *C. parvum* per causare l'infezione [11]. Le oocisti sono resistenti a molti disinfettanti [12, 13] e le opzioni di trattamento disponibili sono limitate e spesso si basano sulla terapia di reidratazione. Nei vitelli, il trattamento con alofuginone lattato non previene e/o non cura completamente la malattia, ma può ridurre l'escrezione di oocisti e la durata della diarrea [14-16].

Per entrambe queste parassitosi, buone pratiche di gestione di allevamento ed igienico-sanitarie sono di fondamentale importanza. Ciò include la riduzione della densità di allevamento, la prevenzione della contaminazione dei mangimi e degli abbeveratoi, ottimizzazione della lettiera per ridurre la contaminazione fecale e la pulizia e la disinfezione degli edifici di stabulazione. Inoltre, studi recenti hanno evidenziato la complessa rete di interazioni che intercorrono tra questi protozoi e la flora commensale intestinale, mostrando il potenziale contributo del microbioma intestinale nel controllo delle infezioni parassitarie [17]. In particolare, per *Cryptosporidium* spp. i cambiamenti nella microflora intestinale man mano che l'animale si accresce o dovuti a cambiamenti nella dieta possono influenzare la capacità del parassita di colonizzare l'intestino [18].

**Progetto di ricerca e piano di attività**

Il progetto di questo assegno di ricerca rientra delle attività previste nel programma del “Centro Nazionale di Ricerca per le Tecnologie Agricole (AGRITECH), spoke 5 “Produttività sostenibile e mitigazione dell'impatto ambientale nei sistemi zootecnici”, in particolare nel task 5.3.6 “Alimentazione di precisione del bestiame per mitigare impatto ambientale e ridurre l'utilizzo di antimicrobici”, che si concentra su “approcci nutrizionali, che possono garantire salute e prestazioni ottimali riducendo sia l'impatto ambientale che l'utilizzo di antimicrobici nei sistemi zootecnici. La riduzione dell'impatto ambientale sarà perseguita attraverso l'implementazione di tecniche innovative di caratterizzazione, preparazione e distribuzione dei mangimi, attraverso l'uso di nuovi ingredienti e/o additivi, e attraverso la modulazione del microbioma ruminale e/o intestinale, che possono contribuire a ridurre l'escrezione di composti non digeriti e/o assunzione di acqua”.

In questo ambito, le attività da svolgere durante l'assegno di ricerca saranno finalizzate all'osservazione dell'influenza del management e della alimentazione sulla presenza di Apicomplexa intestinali negli allevamenti bovini. Tali attività sono incentrate primariamente sullo svolgimento di indagini coprologiche parassitologiche quali/quantitative in diversi sistemi di allevamento.

In particolare, durante l’anno programmato per l’assegno è prevista una prima fase di circa due mesi, durante la quale sarà effettuata l’analisi della bibliografia e la selezione dei gruppi di animali oggetto di studio.

La seconda fase, della durata di circa nove mesi, sarà dedicata alla attuazione di campionamenti fecali da singoli soggetti sottoposti a diverso management e alimentazione in collaborazione con gli altri partner coinvolti nel task 5.3.6. Tali campionamenti si protrarranno durante questo periodo e verranno ripetuti più volte sugli stessi animali.

Su ciascun campione verrà:

- valutata la presenza e il numero di oocisti di *Eimeria* spp. per grammo di feci, utilizzando la tecnica di McMaster ed effettuata l’identificazione delle specie di *Eimeria* coinvolte, mediante esame morfologico dopo coprocoltura;

- valutata la presenza di *Cryptosporidium* spp., sia mediante esame microscopico (con arricchimento e colorazione specifica) che mediante metodiche molecolari. Queste ultime permetteranno inoltre l’identificazione del protozoo a livello di specie e/o genotipo.

Durante l’ultimo mese saranno analizzati i dati ottenuti per valutare l'effetto della alimentazione e delle attività gestionali sulla diffusione di questi parassiti ed elaborare linee guida per buone pratiche di allevamento e di gestione igienico-sanitaria utili a prevenire o controllare le infezioni da apicomplexa intestinali al fine di ridurre al minimo l’uso di prodotti farmacologici.

**Bibliografia**

1. Morgoglione ME, Bosco A, Maurelli MP, Alves LC, Saralli G, Bruni G, Cringoli G and Rinaldi L (2020) A 10-Year Surveillance of Eimeria spp. in Cattle and Buffaloes in a Mediterranean Area. Front. Vet. Sci. 7:410. doi: 10.3389/fvets.2020.00410
2. Makau DN, Gitau GK, Muchemi GK, Thomas LF, Cook EAJ, Wardrop NA, et al. Environmental predictors of bovine Eimeria infection in western Kenya. Trop Anim Health Prod. (2017) 49:409–16. doi: 10.1007/s11250-016-1209-0
3. Lee SH, Kim HY, Lee H, Kim JW, Lee YR, Chae MJ, et al. Eimeria species in cattle with diarrhoea in the Republic of Korea regarding age, season and nature of diarrhea. Vet Rec. (2018) 183:504. doi: 10.1136/vr.104600
4. Alcala-Canto Y, Figueroa-Castillo JA, Ibarra-Velarde F, Vera-Montenegro Y, Cervantes-Valencia ME, Alberti-Navarro A. First database of the spatial distribution of Eimeria species of cattle, sheep and goats in Mexico. Parasitol Res. (2019) 119:1057–74. doi: 10.1007/s00436-019-06548-8
5. Veronesi F, Nisoli L, Diaferia M, Falcini R, Ficola E, Piergili Fioretti D. Influence of a metaphylactic treatment with Baycox ® Bovis on the reproductive performances of Fresian heifers: a preliminary study. Parasitol Res. (2013) 112:2137–42. doi: 10.1007/s00436-013-3373-8
6. Zechner G, Bauer C, Jacobs J, Goossens L, Vertenten G, Taylor MA, et al. Efficacy of diclazuril and toltrazuril in the prevention of coccidiosis in dairy calves under field conditions. Vet Rec. (2015) 176:126. doi: 10.1136/vr.102237
7. Philippe P, Alzieu JP, Taylor MA, Dorchies PH. Comparative efficacy of diclazuril (Vecoxan ®) and toltrazuril (Baycox bovis ® ) against natural infections of Eimeria bovis and Eimeria zuernii in French calves veterinary parasitology December. Vet Parasitol. (2014) 206:129–37. doi: 10.1016/j.vetpar.2014.10.003
8. Mundt HC, Daugschies A, Uebe F, Rinke M. Efficacy of toltrazuril against artificial infections with Eimeria bovis in calves. Parasitol Res. 2003;90:S166–S7.
9. Taylor MA, Catchpole J, Marshall J, Marshall RN, Hoeben D. Histopathological observations on the activity of diclazuril (Vecoxan®) against the endogenous stages of Eimeria crandallis in sheep. Vet Parasitol. 2003;116:305–14.
10. Odden A, Enemark HL, Ruiz A.3, Robertson LJ, ErsdalC, Nes SK, Tømmerberg V and Stuen S. Controlled efficacy trial confirming toltrazuril resistance in a field isolate of ovine Eimeria spp. Parasites & Vectors (2018) 11:394 <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2976-4>
11. Nydam DV, Wade SE, Schaaf SL, Mohammed HO (2001) Number of Cryptosporidium parvum oocysts or Giardia spp cysts shed by dairy calves after natural infection. Am J Vet Res 62:1612–1615
12. Chalmers RM, Giles M (2010) Zoonotic cryptosporidiosis in the UK— challenges for control. J Appl Microbiol 109:1487–1497.
13. Casemore DP, Watkins J (1998) Review of disinfection and associated studies on Cryptosporidium, 1–56. http://dwi.defra.gov.uk/research/ completed- research/reports/dwi0805.pdf
14. Jarvie BD, Trotz-Williams LA, McKnight DR, Leslie KE, Wallace MM, Todd CG, Sharpe PH, Peregrine AS (2005) Effect of halofuginone lactate on the occurrence of Cryptosporidium parvum and growth of neonatal dairy calves. J Dairy Sci 88:1801–1806
15. Lefay D, Naciri M, Poirier P, Chermette R (2001) Efficacy of halofuginone lactate in the prevention of cryptosporidiosis in suckling calves. Vet Rec 148:108–112
16. Trotz-Williams LA, Jarvie BD, Peregrine AS, Duffield TF, Leslie KE (2011) Efficacy of halofuginone lactate in the prevention of cryptosporidiosis in dairy calves. Vet Rec 168:509
17. Burgess SL, Gilchrist CA, Tucker CL, Petri WA Jr. Parasitic protozoa and interactions with the host intestinal microbiota. Infect Immun. (2017) 85:e00101–17. doi: 10.1128/IAI.00101-17.
18. ThomsonS , Hamilton CA, HopeJC, Katzer F, Mabbott NA, MorrisonLJ and InnesEA Bovine cryptosporidiosis: impact, host‑parasite interaction and control strategies Vet Res (2017) 48:42 DOI 10.1186/s13567-017-0447-0

**Title of the research grant**

Influence of management and feeding on intestinal Apicomplexa infections in cattle breeding

**Background**

Parasitic diseases caused by intracellular parasitic protozoa of the phylum Apicomplexa (e.g. coccidiosis due to *Eimeria*, *Isospora* and *Cystoisospora*, cryptosporidiosis due to Cryptosporidium spp., infections by cyst-forming coccidia such as *Neospora*, *Besnoitia*, *Sarcocystis* and *Toxoplasma*) can affect a wide variety of vertebrates.

In particular, coccidiosis caused by *Eimeria* spp. are common in cattle, compromising the health, welfare and production of these animals, especially at a young age [1]. The severity of the infection is related to the *Eimeria* species, the age of the animals, the immunological status of the hosts, the dose of ingested oocysts, environmental factors and herd management [2-4], which can result in the ingestion of a large number of sporulated oocysts (infectious form of these protozoa) together with contaminated feed, water or pastures or following licking of contaminated fur. Coccidiosis can determine significant economic losses as they can cause, in addition to disease and in some cases the death of animals, a reduction in zootechnical performance, predispose livestock to secondary bacterial and viral infections, increase the manpower demand for the care and treatment of infected livestock and the costs of medicines.

Metaphylactic treatments with toltrazuril in the prepatent period or within 24 hours of the onset of diarrheal phenomena are very useful against *Eimeria* infections in cattle [5-7], improving the performance in animals (e.g. faster increase in body weight, positive influence on mean age at first birth, increase in overall pregnancy rate). Furthermore, a correlation of the treatment with the reduction of the excretion of oocysts has been demonstrated, resulting the decrease the environmental contamination, with particular reference to the two species considered to be the main responsible for the clinical coccidiosis, *E. zuernii* and *E. bovis*. [5]. Conversely, treatment of coccidiosis already in the clinical stage is considered inefficient due to the extensive intestinal damage previously caused by the infection [8,9]. Furthermore, several scientific publications by Norwegian researchers have demonstrated the possibility of the emergence of drug resistance to toltrazuril in *Eimeria* species from sheep [10].

With regard to another apicomplexa disease common in calves, such as cryptosporidiosis, the oocysts of *Cryptosporidium* spp. are also transmitted via the fecal-oral route, either directly through contact with faeces, or through food or water. New-born animals infected with *C. parvum*, a species of high zoonotic importance, may present abundant watery diarrhea which usually occurs 3-4 days after ingestion of the oocysts, inappetence, lethargy, dehydration and in some cases with a fatal outcome. Oocyst shedding is not always associated with diarrhoea, but infected calves may shed large numbers (over 1 × 1010) of oocysts each day, which are immediately infective to other susceptible hosts, in which very few *C. parvum* oocyst can cause the infection [11]. Oocysts are resistant to many disinfectants [12, 13] and the available treatment options are limited and often rely on rehydration therapy. In calves, treatment with halofuginone lactate does not prevent and/or completely cure the disease, but may reduce oocyst excretion and the duration of diarrhea [14-16].

For both of these parasitosis, good farm management and sanitation practices are needful. These includes reduction of stocking density, prevention of feed and drinker contamination, litter optimization to reduce faecal contamination and cleaning and disinfection of housing buildings. Furthermore, recent studies have highlighted the complex network of interactions between these protozoa and the intestinal commensal flora, showing the potential contribution of the intestinal microbiome in the control of parasitic infections [17]. In particular, for *Cryptosporidium* spp. changes in the intestinal microflora as the animal matures or due to mutations in diet, can affect the ability of the parasite to colonize the intestine [18].

**Research project and activity plan**

The project of this research grant is part of the activities foreseen in the programme of the “National Research Centre for Agricultural Technologies (AGRITECH), spoke 5 “sustainable productivity and mitigation of environmental impact in livestock systems”, in particular in the task 5.3.6 “Precision feeding of livestock to mitigate environmental impact and reduce antimicrobial utilization”, which is focused on “nutritional approaches, which may guarantee optimal health and performances reducing both environmental impact and antimicrobials utilization in livestock systems. Reduction of the environmental impact will be pursued through implementation of innovative techniques to characterize, prepare and distribute feedstuffs, through use of novel ingredients and/or additives, and through modulation of ruminal and/or intestinal microbiome, which may contribute to reduce the excretion of undigested compounds and/or water intake”.

In this framework, the activities to be carried out during the research grant will be aimed at observing the influence of management and nutrition on the presence of intestinal Apicomplexa in cattle herds. These activities are primarily focused on carrying out qualitative/quantitative parasitological coprological investigations in different farming systems.

In particular, during the year scheduled for the grant, a first phase of about two months is envisaged, during which the analysis of the bibliography and the selection of the groups of animals to be studied will be carried out;

The second phase, lasting approximately nine months, will be dedicated to the implementation of faecal sampling from individual animals subjected to different management and nutrition in collaboration with the other partners involved in task 5.3.6. These samplings will continue during this period and will be repeated several times on the same animals.

On each sample will be:

- evaluated the presence and number of *Eimeria* sp oocysts per gram of faeces, using the McMaster technique and carry out the identification of the *Eimeria* species involved, by morphological examination after coproculture;

- evaluated the presence of *Cryptosporidium* spp. both by microscopic examination (with enrichment and specific staining) and by molecular methods. The latter will also allow the identification of the protozoan at the species and/or genotype level.

During the last month, the data obtained will be analyzed to evaluate the effect of feeding and management activities on the spread of these parasites and to develop guidelines for good breeding and sanitation management practices useful for preventing or controlling apicomplexa infections bowels in order to minimize the use of pharmacological products.

**References**

1. Morgoglione ME, Bosco A, Maurelli MP, Alves LC, Saralli G, Bruni G, Cringoli G and Rinaldi L (2020) A 10-Year Surveillance of Eimeria spp. in Cattle and Buffaloes in a Mediterranean Area. Front. Vet. Sci. 7:410. doi: 10.3389/fvets.2020.00410
2. Makau DN, Gitau GK, Muchemi GK, Thomas LF, Cook EAJ, Wardrop NA, et al. Environmental predictors of bovine Eimeria infection in western Kenya. Trop Anim Health Prod. (2017) 49:409–16. doi: 10.1007/s11250-016-1209-0
3. Lee SH, Kim HY, Lee H, Kim JW, Lee YR, Chae MJ, et al. Eimeria species in cattle with diarrhoea in the Republic of Korea regarding age, season and nature of diarrhea. Vet Rec. (2018) 183:504. doi: 10.1136/vr.104600
4. Alcala-Canto Y, Figueroa-Castillo JA, Ibarra-Velarde F, Vera-Montenegro Y, Cervantes-Valencia ME, Alberti-Navarro A. First database of the spatial distribution of Eimeria species of cattle, sheep and goats in Mexico. Parasitol Res. (2019) 119:1057–74. doi: 10.1007/s00436-019-06548-8
5. Veronesi F, Nisoli L, Diaferia M, Falcini R, Ficola E, Piergili Fioretti D. Influence of a metaphylactic treatment with Baycox ® Bovis on the reproductive performances of Fresian heifers: a preliminary study. Parasitol Res. (2013) 112:2137–42. doi: 10.1007/s00436-013-3373-8
6. Zechner G, Bauer C, Jacobs J, Goossens L, Vertenten G, Taylor MA, et al. Efficacy of diclazuril and toltrazuril in the prevention of coccidiosis in dairy calves under field conditions. Vet Rec. (2015) 176:126. doi: 10.1136/vr.102237
7. Philippe P, Alzieu JP, Taylor MA, Dorchies PH. Comparative efficacy of diclazuril (Vecoxan ®) and toltrazuril (Baycox bovis ® ) against natural infections of Eimeria bovis and Eimeria zuernii in French calves veterinary parasitology December. Vet Parasitol. (2014) 206:129–37. doi: 10.1016/j.vetpar.2014.10.003
8. Mundt HC, Daugschies A, Uebe F, Rinke M. Efficacy of toltrazuril against artificial infections with Eimeria bovis in calves. Parasitol Res. 2003;90:S166–S7.
9. Taylor MA, Catchpole J, Marshall J, Marshall RN, Hoeben D. Histopathological observations on the activity of diclazuril (Vecoxan®) against the endogenous stages of Eimeria crandallis in sheep. Vet Parasitol. 2003;116:305–14.
10. Odden A, Enemark HL, Ruiz A.3, Robertson LJ, ErsdalC, Nes SK, Tømmerberg V and Stuen S. Controlled efficacy trial confirming toltrazuril resistance in a field isolate of ovine Eimeria spp. Parasites & Vectors (2018) 11:394 <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2976-4>
11. Nydam DV, Wade SE, Schaaf SL, Mohammed HO (2001) Number of Cryptosporidium parvum oocysts or Giardia spp cysts shed by dairy calves after natural infection. Am J Vet Res 62:1612–1615
12. Chalmers RM, Giles M (2010) Zoonotic cryptosporidiosis in the UK— challenges for control. J Appl Microbiol 109:1487–1497.
13. Casemore DP, Watkins J (1998) Review of disinfection and associated studies on Cryptosporidium, 1–56. http://dwi.defra.gov.uk/research/ completed- research/reports/dwi0805.pdf
14. Jarvie BD, Trotz-Williams LA, McKnight DR, Leslie KE, Wallace MM, Todd CG, Sharpe PH, Peregrine AS (2005) Effect of halofuginone lactate on the occurrence of Cryptosporidium parvum and growth of neonatal dairy calves. J Dairy Sci 88:1801–1806
15. Lefay D, Naciri M, Poirier P, Chermette R (2001) Efficacy of halofuginone lactate in the prevention of cryptosporidiosis in suckling calves. Vet Rec 148:108–112
16. Trotz-Williams LA, Jarvie BD, Peregrine AS, Duffield TF, Leslie KE (2011) Efficacy of halofuginone lactate in the prevention of cryptosporidiosis in dairy calves. Vet Rec 168:509
17. Burgess SL, Gilchrist CA, Tucker CL, Petri WA Jr. Parasitic protozoa and interactions with the host intestinal microbiota. Infect Immun. (2017) 85:e00101–17. doi: 10.1128/IAI.00101-17.
18. ThomsonS , Hamilton CA, HopeJC, Katzer F, Mabbott NA, MorrisonLJ and InnesEA Bovine cryptosporidiosis: impact, host‑parasite interaction and control strategies Vet Res (2017) 48:42 DOI 10.1186/s13567-017-0447-0