



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**FACOLTÀ DI MEDICINA VETERINARIA**

Dipartimento di Scienze Sperimentali Veterinarie

TESI DI LAUREA

**Valutazione dell'efficacia di moxidectina e  
fenbendazolo nel controllo delle cyathostomiosi  
degli equini**

Relatore: Dott. Antonio Frangipane di Regalbono

Correlatore: Dott. Donato Traversa

Laureanda: Elisa Broccardo

ANNO ACCADEMICO 2010 – 2011



*Ci vuole un gran fisico per correre dietro ai sogni...*

*Stefano Benni*

...ma sono convinta che, se avessi corso da sola, questo mio grande sogno non si sarebbe realizzato!

Un grazie sincero a tutti coloro che mi sono stati vicini in questa avventura.

In modo particolare ai miei genitori e ai miei nonni, che non mi hanno mai fatto mancare il loro sostegno.

Grazie ad Emanuele, per aver sempre pensato che ce la potevo fare, anche quando io per prima non ci credevo.

Grazie ai miei compagni di corso e ai miei coinquilini, che hanno condiviso con me quest'avventura padovana; non sarebbe stato lo stesso senza di voi! A tutti i miei amici, per non avermi mai fatta sentire sola.

E grazie al Prof. Frangipane (affettuosamente Tony), al Dott. Donato Traversa, a Stefano Cominato e a tutti i Parassitologi del Dipartimento, senza il vostro aiuto e la vostra disponibilità tutto questo non sarebbe stato possibile.



# INDICE

<b><u>INDICE</u></b> .....	<b>V</b>
<b>1 <u>INTRODUZIONE</u></b> .....	<b>1</b>
<b>2 <u>STRONGILOSIS INTESTINALI</u></b> .....	<b>3</b>
2.1 Eziologia.....	3
2.2 Caratteristiche morfologiche.....	4
2.2.1 Grossi strongili.....	4
2.2.2 Piccoli strongili.....	7
2.3 Diffusione.....	9
2.3.1 Diffusione in Italia.....	11
2.4 Ciclo biologico.....	14
2.4.1 Fase esogena del ciclo.....	15
2.4.2 Fase endogena del ciclo, grossi strongili.....	16
2.4.3 Fase endogena del ciclo, piccoli strongili.....	17
2.5 Epidemiologia.....	19
2.5.1 La situazione in Italia.....	23
2.6 Patogenesi e sintomatologia.....	24
2.6.1 Grossi strongili.....	24
2.6.2 Piccoli strongili.....	28

2.7 Diagnosi.....	30
2.7.1 Esami copromicroscopici qualitativi.....	30
2.7.2 Esami copromicroscopici quantitativi.....	34
2.7.3 Limiti dei metodi diagnostici copro microscopici.....	36
2.8 Lotta alla parassitosi.....	36
2.8.1 Interventi ambientali.....	37
2.8.2 Interventi farmacologici.....	39
2.8.3 Chemioresistenza.....	48
<b>3. <u>SCOPO DELLA RICERCA</u></b> .....	<b>53</b>
<b>4. <u>MATERIALI E METODI</u></b> .....	<b>55</b>
4.1 Scelta e descrizione dell'allevamento.....	55
4.2 Scelta degli animali.....	58
4.3 Protocollo di trattamento.....	59
4.4 Analisi di laboratorio.....	60
4.5 Prelievi al macello.....	63
4.6 Preparazione del campione per la ricerca delle larve.....	64
4.7 Ricerca delle larve mediante transilluminazione.....	66
4.8 Analisi dei dati.....	67
4.8.1 Prove in vivo (FECRT- Fecal Egg Count Reduction Test).....	67
4.8.2 Rilievi post mortem.....	68

<b>5. <u>RISULTATI</u></b> .....	71
5.1 Prove in vivo (FECRTs).....	71
5.2 Rilievi post mortem.....	74
<b>6. <u>CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE</u></b> .....	79
<b><u>BIBLIOGRAFIA</u></b> .....	85



# 1. INTRODUZIONE

Le malattie parassitarie che colpiscono gli equini sono innumerevoli e, pur non rappresentando frequentemente un rischio per la vita dell'animale, hanno la capacità di comprometterne lo stato fisico e peggiorarne il rendimento, sia a livello sportivo che di resa al macello.

In particolare l'infestazione da piccoli strongili intestinali (cyathostomiosi) è ritenuta, oggigiorno, una delle più diffuse, con prevalenze che vanno dall'80% al 100% degli allevamenti nella maggior parte del mondo (vedi paragrafo. 2.3). Oltre che per questi motivi, le cyathostomiosi hanno richiamato l'interesse della comunità scientifica anche per l'aumento, all'interno della popolazione parassitaria, di ceppi resistenti ad uno o più farmaci antielmintici (vedi paragrafo 2.8.3).

Questo lavoro, che vede la collaborazione del Dipartimento di Scienze Sperimentali Veterinarie dell'Università degli studi di Padova e del Dipartimento di Scienze Biomediche Comparate dell'Università degli Studi di Teramo, si inquadra all'interno di un percorso di ricerca volto a rilevare la diffusione di tale infestazione nel nostro Paese, compresa la presenza di ceppi farmacoresistenti, ed a confrontare l'azione dei farmaci antielmintici più utilizzati su tutte le fasi di sviluppo dei parassiti (stadi larvali incistati e stadi liberi nel lume) (Traversa *et al.*, 2007-2009; Milillo *et al.* 2009; Frangipane di Regalbono *et al.*, 2009; Pozzato, 2009).

Il presente studio riguarda, nello specifico, la comparazione dell'efficacia di moxidectina e di fenbendazolo nel controllo delle cyathostomiosi, con particolare attenzione all'effetto sulle larve incistate e/o in ipobiosi a livello di mucosa del grosso intestino dei cavalli. Vengono pertanto presentati e discussi solo alcuni risultati relativi ad un progetto di ricerca più ampio e che in tempi successivi vedrà l'attuazione di ulteriori analisi sui campioni di mucosa intestinale e sui parassiti raccolti. In particolare, tali campioni verranno analizzati presso il Dipartimento di Scienze Biomediche Comparate dell'Università degli Studi di Teramo, al fine di isolare, contare (tramite digestione enzimatica), identificare (mediante tecniche biomolecolari) le larve incistate, nonché di confrontare gli effetti (risposta infiammatoria) dei due farmaci sulla mucosa stessa.

Questo progetto vuole pertanto rappresentare una piccola "tessera" da aggiungere al mosaico delle conoscenze finalizzate alla messa a punto di idonei protocolli di trattamento che permettano di controllare in maniera efficace le cyathostomiosi e, nel contempo, di ridurre la pressione selettiva verso ceppi farmacoresistenti, preservando così l'efficacia delle molecole antielmintiche a disposizione sul mercato.



## 2. STRONGILOSI INTESTINALI

### 2.1 Eziologia

Le strongilosi intestinali sono malattie sostenute da nematodi (vermi tondi) che si localizzano a diversi livelli dell'apparato digerente e che vengono denominati strongili.

Con questo termine si identificano tutti i nematodi appartenenti agli ordini RHABDITA e STRONGYLIDA, che parassitano l'apparato digerente dei ruminanti, suini ed equini. In realtà la nomenclatura ufficiale strettamente parassitologica indicherebbe come strongili solo le specie appartenenti al genere *Strongylus*, che parassitano esclusivamente il cavallo. Tuttavia, a scanso di equivoci, in questo lavoro si ricorrerà alla terminologia, ormai entrata nell'uso comune, che classifica le strongilosi equine come malattie parassitarie sostenute da numerose specie di strongili, spesso in associazione tra loro, anche se ciò rappresenta un'inesattezza tassonomica. Molto spesso gli Autori di lingua anglosassone classificano i parassiti intestinali degli equidi come grossi (large) e piccoli (small) strongili. Non esiste tuttavia un pieno accordo su quali generi inserire nei due gruppi.

Infatti alcuni Autori chiamano grossi strongili solo i parassiti appartenenti al genere *Strongylus* e piccoli strongili tutti gli altri; altri Autori considerano grossi tutti gli appartenenti alla sottofamiglia STRONGYLINAE, mentre i piccoli strongili sono nominati Cyathostomi.

E' quindi necessaria un'ulteriore distinzione chiarificatrice:

Con grandi strongili intendiamo i parassiti appartenenti alla famiglia STRONGYLIDAE, alla sottofamiglia STRONGYLINAE, ai generi *Strongylus* (le cui principali specie sono *S. vulgaris*, *S. edentatus*, *S. equinus*) e *Triodontophorus* (tab.1).

Con piccoli strongili intendiamo tutti gli altri riportati in tab.1, chiamando cyathostomi, o cyathostomini, gli appartenenti alla sottofamiglia CYATHOSTOMINAE, che rappresenta il gruppo più importante e diffuso.

Esso comprende numerose specie (ad oggi ne sono state identificate 52), distribuite in diversi generi, tra i quali i più frequenti sono: *Cyathostomum*, *Cylicocyclus*, *Cylicodontophorus* e *Cylicostephanus*.

PHYLUM	ORDINE	FAMIGLIA	SOTTOFAMIGLIA	GENERE
Nematoda	Strongylida	Strongylidae	Strongylinae	<i>Strongylus (a)</i>
				<i>Triodontophorus (a)</i>
			Cyathostominae	<i>Cyathostomum (b)</i>
				<i>Cylicocyclus (b)</i>
				<i>Cylicodontophorus (b)</i>
				<i>Poteriostomum (b)</i>
				<i>Gyalocephalus (b)</i>
				<i>Oesophagodontus robustus (b)</i>
				<i>Craterostomum (b)</i>
				Trichostrongylidae
	<i>Axei (b)</i>			
	Rhabditidae	Strongyloididae	<i>Strongyloides</i>	
<i>Westeri (b)</i>				

**Tab. 1.** Classificazione degli strongili gastro-intestinali degli equini.

Con la lettera *a* sono identificati i generi classificati come grossi strongili; con la lettera *b* quelli classificati come piccoli strongili.

## **2.2 Caratteristiche morfologiche**

### **2.2.1 Grossi strongili**

Al genere *Strongylus* (ordine Strongylida, famiglia STRONGYLIDAE, sottofamiglia STRONGYLINAE) appartengono nematodi di forma allungata, rettilinei, rigidi e di colorazione grigio-brunastra. Presentano un orifizio orale lungo, diretto in avanti. L'apertura buccale è orlata da una sorta di denticoli a palizzata (“vermi a palizzata”), mentre sul fondo possono essere presenti dei denti, in numero diverso a seconda della specie; l'esofago ha un'apertura stretta (Euzeby, 1963).

Nel maschio la borsa caudale è ben sviluppata, presenta 2 spicoli uguali, lunghi e sottili, ed un gubernaculum. Nelle femmine l'apertura vulvare si trova sulla faccia ventrale del terzo posteriore del corpo, davanti all'ano.

Un tempo i grossi strongili venivano divisi in tre generi: *Alfortia*, *Delafondia* e *Strongylus* (Ershow, 1949). Attualmente, però, i primi due vengono considerati sinonimi del genere *Strongylus* (Campbell *et al.*, 1995), cui appartengono le specie:

- ***Strongylus vulgaris***: la forma adulta, di colore grigio-brunastro, vive saldamente infissa alla mucosa del cieco e del colon tramite la capsula buccale, dove svolge principalmente un'azione sottrattiva di tipo ematofago (Fig. 1a). Il maschio misura da 10 a 15 mm, possiede una borsa caudale con lobo dorsale triangolare e la costa dorsale presenta tre appendici, di cui la mediana è la più lunga. Gli spicoli misurano 1,3-1,5 mm.

La femmina è di dimensioni maggiori: da 13,5 a 25 mm; la vulva si trova a circa 9 mm dall'estremità caudale.

L'orifizio orale è di forma circolare, aperto e profondo, con una corona radiale esterna, data da elementi a palizzata (Fig 1a). La capsula buccale è profonda 0,4-0,5 mm e larga 0,5-0,7 mm, ornata sul fondo da 2 caratteristici denticoli.

Le uova hanno dimensione di 80-90 x 45-50  $\mu\text{m}$ . La larva di terzo stadio è lunga 1 mm e presenta 32 cellule intestinali; la porzione caudale è filiforme e munita di guaina.

- ***Strongylus edentatus***: vive nel cieco e nel colon ed è ematofago (Fig. 1b). Ha dimensioni intermedie tra quelle di *S. vulgaris* e *S. equinus*, dai quali è distinguibile per due caratteristiche morfologiche:

1. Nella parte anteriore del corpo presenta un restringimento che delimita la regione cefalica;

2. Il fondo della capsula buccale è priva di denti.

Il maschio è lungo circa 25 mm, con borsa caudale che presenta un lobo dorsale quadrangolare e la costa dorsale è costituita da 3 appendici, di cui l'esterna è la più lunga. Gli spicoli misurano 2,4 mm.

La femmina ha lunghezza di 30-40 mm e la vulva dista circa 10 mm dall'estremità caudale.

Le dimensioni delle uova sono di 80 x 50 µm, con parete sottile. Le larve di terzo stadio misurano 0,8 mm, hanno 20 cellule intestinali e lunga coda munita di guaina.

- ***Strongylus equinus***: tra gli strongili è quello di dimensioni maggiori, anch'esso di colore grigio-bruno (Fig. 1c).

Vive nel cieco e nel colon e, come i precedenti, è ematofago. Il maschio ha una lunghezza di 25-35 mm, la borsa caudale ha due grandi lobi laterali e uno piccolo, dorsale. E' presente una costa con 3 appendici di uguale lunghezza. Gli spicoli misurano da 2 a 2,6 mm.

La femmina ha una lunghezza di 35-55 mm e presenta la vulva a circa 12 mm dall'estremità caudale.

La capsula buccale è molto profonda, fino a 1,1 mm. Sul fondo, in sede subdorsale, si trova un grosso dente bifido e due denti subvebrali ad esso, piccoli e conici, tali da sembrare 4.

Le uova misurano 70 x 50 µm ed hanno un guscio sottilissimo. La larva di terzo stadio è lunga 1 mm, ha 16 cellule intestinali, la coda appuntita e ricoperta da una guaina.

- ***Triodontophorus***: viene normalmente compreso tra i grossi strongili (Fig. 1d). Quest'ultimo genere è presente nel colon e si differenzia dagli altri strongili per la presenza, all'inizio dell'esofago, di un incavo con tre denticoli bifidi all'estremità. Essi sono piantati sull'orifizio esofageo e sporgono dal fondo della capsula buccale. I maschi misurano circa 20 mm, le femmine 25 mm e sono di colore rosso-bruno.



a.



b.



c.



d.

**Fig. 1** a. *S. vulgaris*, b. *S. edentatus*, c. *S. equinus*, d. *Triodontophorus*.

**Parasites and Parasitic Diseases of Domestic Animals.** Dr. Colin Johnstone (principal author)

Copyright © 1998 University of Pennsylvania

### 2.2.2 Piccoli strongili

Piccoli strongili (small strongyles) o cyathostomini (Fig. 2a-b):

per la maggior parte appartengono allo stesso ordine e famiglia, nonché alla sottofamiglia cyathostominae, che comprende numerose specie, distribuite nei diversi generi riportati in tab. 1.

Nel gruppo dei piccoli strongili vengono oggi riconosciute 52 specie (Lichtenfles *et al.*, 2008), distinte in base alle caratteristiche morfologiche (lunghezza e spessore della capsula buccale, numero di elementi che compongono la corona radiata, ecc.) e biomolecolari.

Nell'apertura buccale circolare si inserisce una corona esterna di denticoli, meno evidente che nei grossi strongili. Attorno alla bocca vi è un cercine ben sviluppato, con papille distinte. L'esofago è poco dilatato, privo di denti sul contorno.

I maschi sono lunghi 7-9 mm, le femmine 8-12 mm. La vulva è posta in sede preanale. Le uova sono normalmente più grandi rispetto a quelle dei grossi strongili, anche se questo aspetto non costituisce un carattere differenziale.

Nei parassiti giovani è presente una colorazione rosso vivo, sono dotati di una capsula buccale più larga che alta e l'esofago è ristretto sia anteriormente che posteriormente, delimitando una sorta di stomaco. Da adulti si trovano liberi nel lume del grosso intestino. Tra le specie più patogene ricordiamo *Cyathostomum tetracantum* (Euzeby, 1982).

All'ordine strongylida appartiene anche la famiglia TRICHOSTRONGYLIDAE, di cui ricordiamo la specie *Trichostrongylus axei* (Fig. 2c). Questo parassita è cosmopolita; il maschio è lungo dai 3 ai 4 mm e la femmina dai 4 ai 5 mm. Si localizza nello stomaco del cavallo, a livello della parte digestiva ed escrettrice, internamente al lume delle ghiandole gastriche. Si tratta di un nematode non specie specifico, poiché parassiti isolati nell'abomaso bovino hanno attecchito anche nel cavallo (Boch e Supperer, 1980) e sembra possa infestare persino l'uomo (Soulsby, 1982).

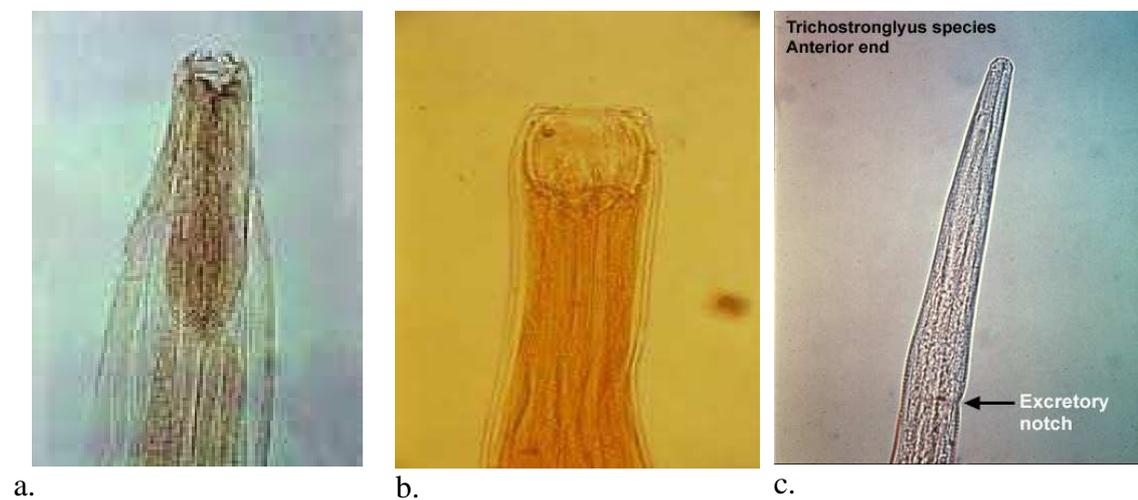
Nella femmina la vulva si trova nel terzo posteriore del corpo. Le uova misurano 80 x 40 µm, con poli nettamente diseguali. La larva di terzo stadio misura 700 µm.

Nella classificazione degli strongili gastro-intestinali degli equidi (tab. 1) sono inoltre compresi i parassiti appartenenti all'ordine RHABDITA, famiglia STRONGYLIDAE, cui appartiene la specie *Strongiloides westeri*. Questo nematode vive nel piccolo intestino e misura 8 – 9 mm; la rima labiale è poco definita, la capsula buccale piccola e inerme. La coda è conica e l'esofago è filiforme, pari ad 1/5 della lunghezza del corpo e senza bulbo nelle femmine partenogeniche. Le uova misurano 50x40 µm e vengono rilasciate all'estero già embrionate. Le larve di terzo stadio sono prive di guaina, hanno la coda a V e misurano circa 600 µm.

Ai piccoli strongili appartiene anche *Craterostomum* spp. , che si localizza a livello di cieco e colon.

I maschi misurano 5 mm e le femmine da 5 a 8 mm. La capsula buccale è a forma di calice e priva di denticoli, con un restringimento dotato di corona radiata (Ducan, 1969; Casarosa, 1985).

Infine anche *Oesophagodontus robustus* viene classificato tra i piccoli strongili. Questo si localizza nel tratto ventrale del colon, è ematofago, di colorito rosso-brunastro. Possiede tre denticoli a forma di lancette, infissi nella parte iniziale dell'esofago, non sporgenti in cavità orale. I maschi sono lunghi circa 15 mm, le femmine 20 mm.



**Fig. 2 a.** *Cyathostomum*, **b.** *Cylicocyclus*, **c.** *Trichostrongilus*.

**a. Parásitos y enfermedades parasitarias de los animales domésticos.** Dr. Colin Johnstone (autor principal).Derechos de copia © Universidad de Pennsylvania.

**b.** Copyright ©2010 VIRBAC S.A. All rights reserved - P.IVA 06802290152

**c. Parasites and Parasitic Diseases of Domestic Animals.** Dr. Colin Johnstone (principal author)

Copyright © 1998 University of Pennsylvania

## **2.3 Diffusione**

Tra i diversi elminti che possono interessare gli equidi, gli strongili intestinali risultano senza dubbio tra i più diffusi al mondo, grazie ad una particolare capacità di adattamento alle diverse condizioni climatiche, al diverso modo di vivere degli animali e al loro indirizzo produttivo.

Queste parassitosi, infatti, sono presenti con prevalenze costantemente molto elevate, con valori minimi di positività intorno al 50% e massimi sempre superiori all'80 – 90%, sino addirittura alla totalità dei capi. Nel continente americano si ha una prevalenza tra l'85 e il 100% (Canada, USA, Brasile e Cile); in Europa si hanno prevalenze tra il 90 e il 100% (Gran Bretagna, Germania e Spagna); in Italia i dati disponibili indicano una positività del 70 – 100% in qualsiasi regione. Si ritiene che quasi nessun allevamento, scuderia o gruppo di cavalli sia esente da queste elmintiasi.

Estremamente spiccata risulta la polispecificità eziologica: numerose sono, infatti, le specie elmintiche identificate e diverse quelle compresenti nello stesso allevamento o medesimo soggetto.

La distribuzione delle diverse specie e generi è molto variabile; Ambrosi (1995) riporta alcuni dati indicativi della positività agli strongili del cavallo in Italia, negli anni '90:

- *Strongylus vulgaris*: dal 60% all'80% dei capi.
- *Strongylus edentatus*: dal 70% fino al 90% dei capi ( ma talora attorno al 50% circa).
- *Strongylus equinus*: dal 10% al 15%, circa.
- Cyathostomini: dal 90% al 100%
- *Trichostrongylus axei*: dal 2% al 21%, circa.

Vi sono, però, molti fenomeni che hanno modificato la diffusione degli strongili gastrointestinali negli equidi: se prima degli anni '80 oltre l'80% delle coliche erano dovute a *S. vulgaris* (Drudge e Lyons, 1977) successivamente, visto il largo impiego di benzimidazolici si osservò una netta diminuzione dello stesso ma, parallelamente, anche un aumento dei Cyathostomini che, al momento, risultano i parassiti più diffusi. Essi vedono 52 specie identificate (Lichtenfels *et al.*, 2008), di cui 13 sono le più diffuse a livello mondiale: *Cyathostomum catinatum*, *Cyathostomum labiatum*, *Cyathostomum labratum*, *Cyathostomum pateratum*, *Cylicocycclus ashwothi*, *Cylicocycclus leptostomum*, *Cylicocycclus insigne*, *Cylicocycclus nassatus*, *Cylicostephanus calicatus*, *Cylicostephanus goldi*, *Cylicostephanus longibussatus*, *Cylicostephanus minutus* e *Coronocycclus coronatus* (Gawor, 1995; Silva *et al.*, 1999; Kaplan, 2002; Chapman *et al.*, 2003; Kuzmina *et al.*, 2005).

La patologia più grave da essi sostenuta viene definita “Catostominosi larvale” (Reinemeyer, 1984; Giles *et al.*, 1985), i cui sintomi sono rappresentati da diarrea, forte perdita di peso, presenza di edemi diffusi, caduta di pelo nel periodo invernale. Nei casi più critici si può arrivare anche alla morte, che comunque rappresenta un evento piuttosto raro.

Secondo Battelli (1992) il notevole aumento dei piccoli strongili e la presenza molto diminuita dei grossi strongili (sebbene ancora segnalati nel nostro Paese secondo Pilo *et al.*, 2009) vede differenti cause:

- Resistenza ai benzimidazolici.
- Incistamento delle forme larvali nella mucosa intestinale (cosiddetto “rifugio antielmintico”): in questo modo le larve sono meno aggredibili dagli antielmintici.
- Minor periodo di prepatenza (5-8 settimane) rispetto ai grossi strongili. Questo fenomeno è stato osservato soprattutto nei puledri e negli adulti con scarsa immunità ed è attribuibile anche alla selezione di Cyathostomini a minor periodo di prepatenza.
- Prolungamento del periodo di prepatenza negli adulti, vista la maggior resistenza dell'ospite, con la presenza di larve ipobiotiche per oltre due anni.

### **2.3.1 Diffusione in Italia**

Molti Autori hanno effettuato ricerche per stabilire l'entità del problema riguardante le infestazioni da strongili intestinali. Ecco un breve excursus storico:

Deiana (1956), su 108 cavalli esaminati in Sardegna, riscontrò una positività del 100% per *S. vulgaris* e *S. edentatus*, del 3% per *S. equinus*, del 2,7% per *Poteriostomum* e del 28% per *Triodontophorus*.

Tassi e Widenhorn (1972) studiarono 104 allevamenti equini situati in diverse regioni italiane, effettuando esami coprologici per la ricerca di strongili su 3624 soggetti, testando il 50% dei soggetti presenti in allevamento. Il 100% degli allevamenti e il 75% degli animali risultarono positivi.

Balletti e Orlandi (1973) esaminarono 120 campioni di feci di cavalli appartenenti alle Forze Armate. Di questi il 22,5% risultò positivo per ascaridi e il 98,3% per uova di strongili che, nell'85,6% dei casi erano appartenenti a due o più specie.

Mannini e Agnoletti (1980) tennero sotto osservazione per un anno 63 cavalli nella provincia di Firenze, rilevando una positività per strongili dell'87%, contro una positività del 39% per strongiloidi e del 3% per ascaridi.

Orlandi (1980) compì un'indagine su 581 cavalli nelle provincie di Ascoli-Piceno e Macerata. L'obiettivo era quello di porre in evidenza possibili variazioni di positività in animali che differivano non solo per tipo di allevamento ed età, ma anche per utilizzo (cavalli da carne, sella o sport). L'81,3% degli animali risultò positivo per strongili, il 23,7% per ascaridi e il 4,2% per *S. westeri*. Negli animali allo stato brado o semibrado la positività era del 98,4% per strongili e del 24,3% per ascaridi, mentre per quelli allevati in scuderia risultò, rispettivamente, 83,6% e 13,2%.

Ambrosi e Guglielmi (1980) esaminarono 162 equidi nelle Marche. La positività che riscontrarono fu del 98,1% per strongili e 24,4% per ascaridi. Gli animali furono poi divisi in tre categorie: puledri di età inferiore ad un anno, di età compresa tra uno e due anni ed età superiore a due anni. Inoltre, in ciascun gruppo, vi erano animali che avevano vissuto per cinque mesi tra i 700 e i 1500 m di altitudine e altri che, almeno durante l'anno in corso, avevano condotto vita di scuderia. L'indagine evidenziò come l'infestazione da strongili fosse meno diffusa nei soggetti sotto l'anno di età (90% contro il 100% delle altre due classi) mentre gli ascaridi fossero molto più presenti (72%) nella prima classe, rispetto alla seconda (10%) e alla terza (2,4%). Inoltre la positività risultò inferiore negli animali che avevano monticato, sempre mostrando una prevalenza di piccoli strongili.

Ambrosi (1988) mise a confronto due diversi allevamenti: nel primo riscontrò una positività del 100% per strongili e del 58% per ascaridi; nel secondo, la medesima positività per strongili e del 45% per ascaridi.

Battelli *et al.* (1993), in un'indagine condotta su 38 fattrici di un allevamento di trotter nella provincia di Bologna, con accesso al pascolo da marzo a novembre, hanno riscontrato una positività media del 91%. L'identificazione larvale ha inoltre posto in evidenza una netta prevalenza di Cyatostomini rispetto a *S. vulgaris*, con un rapporto di 10 a 1.

Pietrobelli *et al.* (1995), in un'indagine effettuata in provincia di Udine su 335 cavalli, hanno riscontrato prevalenze pari al 78% per strongili intestinali e del 24% per ascaridi. In 6 puledri, inoltre, sono state trovate oocisti di *Eimeria leuckarti*.

L'identificazione degli strongili ha rilevato la presenza di soli Cyatostomini. In tale indagine gli accertamenti copromicroscopici sono stati eseguiti, negli stessi allevamenti, in due diversi momenti dell'anno: giugno-luglio e novembre-dicembre, con positività del 76% nel primo periodo e del 78% nel secondo.

Nel 2009 gli studi condotti da Pozzato hanno rilevato, nel nord-est del nostro Paese, una positività per piccoli strongili del 100% delle aziende indagate e del 73,6% degli animali; nello specifico i valori di cavalli trovati positivi oscillavano tra il 46,2% al 76,5% in Veneto e tra il 74,3% e il 94,3% in Friuli Venezia Giulia. Le analisi molecolari svolte sugli elementi parassitari rinvenuti hanno permesso di ritrovare tutte e 13 le specie di Cyathostimini più diffuse a livello mondiale (citate in precedenza), con una situazione di polispecificità eziologica (n. specie/azienda) che oscillava da 3 a 13 specie per allevamento, con una media di 9,5. Tali risultati confermano quanto rinvenuto in altre regioni d'Italia come Toscana, Abruzzo, Lazio, Umbria, Puglia, Basilicata e Calabria (Milillo *et al.*, 2009). Inoltre le specie più rappresentate, ritrovate in questi due studi (*Cyathostomum catinatum*, *Cylicocyclus nassatus*, *Cylicostephanus longibursatus* e *Cyathostomum pateratum*), sono state descritte come le più diffuse anche negli Stati Uniti (Reinhemeyer *et al.*, 1984; Chapman *et al.*, 2002) ed in Australia (Boxell *et al.*, 2004), ad eccezione di *C. pateratum*. La specie *C. minutus*, che in Italia (Pozzato, 2009; Milillo *et al.*, 2009) e Australia (Boxell *et al.*, 2004) risulta la meno diffusa, è invece particolarmente presente in Paesi quali Stati Uniti (Reinemeyer *et al.*, 1984; Chapman *et al.*, 2002), Brasile (Da Silva Anjos *et al.*, 2006) e Ucraina (Kuzmina *et al.*, 2005).

In generale, da tutte le ricerche effettuate emerge: una elevata diffusione delle strongilosi intestinali, una minore diffusione delle ascaridiosi e un'importanza decisamente secondaria per tutte le altre elmintiasi. Inoltre, nonostante la frequenza di alcune specie possa cambiare nelle diverse indagini, le similitudini riscontrate farebbero pensare che le popolazioni di Cyathostomini siano caratterizzate da una certa stabilità.

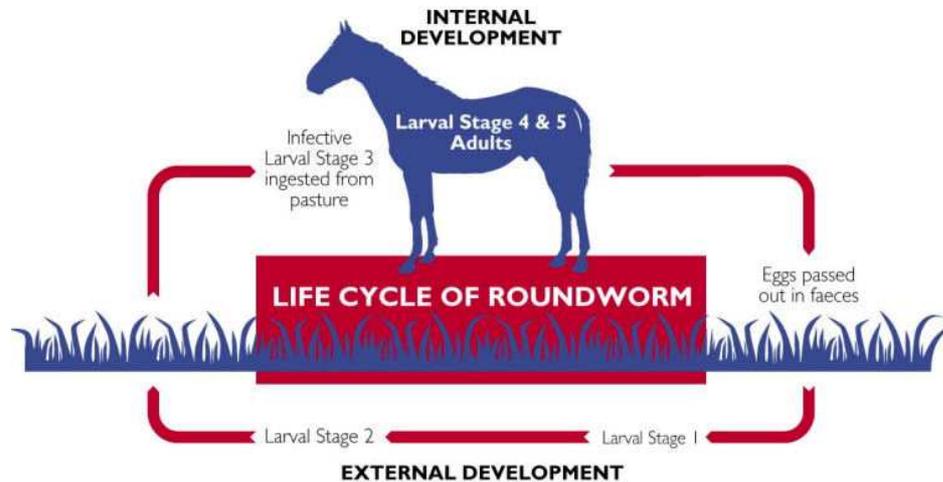
## **2.4 Ciclo biologico**

Il ciclo biologico degli strongili è di tipo diretto, senza il coinvolgimento di ospiti intermedi, e si compone di due fasi ben distinte: la prima, endogena, che avviene all'interno dell'ospite parassitato e la seconda, esogena o di disseminazione, che avviene nell'ambiente esterno (Fig. 3). Le femmine, all'interno dell'ospite, dopo l'accoppiamento e la fecondazione, depongono le uova, che vengono portate all'esterno assieme alle feci. Il numero di uova non è rappresentativo di quello degli adulti presenti e varia in rapporto a diversi fattori:

- la prolificità degli elminti: differisce tra i diversi generi ed in alcuni casi è decisamente elevata; ad esempio la femmina di *S. vulgaris* depone nell'intestino dell'ospite circa 300.000 uova ogni giorno;
- il numero dei parassiti adulti presenti su uno stesso ospite: non esiste una correlazione diretta ma maggiore è il numero di parassiti e minore sarà la produzione per ogni singolo soggetto;
- la stagione: sono state evidenziate numerose variazioni stagionali nell'eliminazione delle uova, con un notevole aumento in primavera, detto “spring rise”, e in autunno, “fall rise”;
- li “lactation rise”: le fattrici in allattamento costituiscono la principale riserva di questa elmintiasi e la maggior causa di contaminazione ambientale.

Le uova, giunte nell'ambiente esterno, sviluppano al loro interno la larva di primo stadio (L1) per poi schiudere e rilasciare tale larva, che evolve velocemente, passando attraverso il secondo stadio larvale (L2) e diventando larva di terzo stadio (L3) o infestante. Per poter completare questa evoluzione devono esserci condizioni particolari di temperatura, umidità ed ossigenazione, senza le quali difficilmente può avvenire la schiusa e la sopravvivenza del parassita sul terreno. Le piogge risultano particolarmente importanti, sia perchè mantengono elevato il grado di umidità (90%), sia perchè, con temperature di 20-25°C, favoriscono l'abbandono della massa fecale da parte delle larve e la loro dispersione nel terreno: si nota, infatti, un loro aumento sull'erba dei pascoli dopo le precipitazioni (Slocombe, 1985). Se il terreno è soffice ed areato, oltre a favorire lo sviluppo degli elementi infestanti, ne facilita il movimento, permettendo alle L3 di coprire distanze maggiori (Ogbourne, 1973).

Mentre la fase esogena, se si esclude *S. westeri*, che sarà trattato a parte, è sostanzialmente analoga per tutte le specie, la fase endogena presenta notevoli differenze tra grandi e piccoli strongili.



**Fig. 3** Ciclo biologico degli strongili.

© University of Liverpool

### 2.4.1 Fase esogena del ciclo

Dopo che le femmine gravide hanno deposto le uova all'interno dell'intestino dell'ospite queste vengono portate all'esterno assieme al materiale fecale. Se il range di temperatura è ottimale (per *S. vulgaris* questo va dagli 8 ai 38°C e, ad una temperatura media di 23°C, le uova schiudono in 20-24 ore), la morula all'interno dell'uovo stesso evolve a larva di primo stadio (L1), che fuoriesce nel giro di poche ore (Rupasinghe e Ogbourne, 1978). Grazie alla conformazione rabditoide dell'esofago, le larve L1 sono in grado di nutrirsi dei batteri contenuti nella massa fecale e di crescere. In circa 7-10 giorni (3-4 per i piccoli strongili) viene raggiunto il secondo stadio larvale (L2) e, successivamente, il terzo (L3), quello infestante. In quest'ultima fase di sviluppo l'esofago si modifica da rabditoide a filiforme, le L3 non sono pertanto in grado di nutrirsi e sopravvivono nell'ambiente utilizzando le riserve accumulate durante i primi due stadi di sviluppo. Se le condizioni esterne sono particolarmente sfavorevoli l'evoluzione sarà rallentata, tanto da richiedere tempi prolungati, fino a 20 giorni (Euzeby, 1963). Le L3 sono dotate di grande mobilità e ricercano continuamente zone umide, mentre rifuggono dall'irradiazione solare diretta e del calore secco, che rappresentano i principali pericoli per la loro

sopravvivenza. Esse si localizzano spesso sugli steli d'erba durante le prime ore del mattino e della sera (geotropismo negativo), mentre preferiscono stare sul terreno nelle ore più calde, secche e luminose (igrotropismo e fototropismo positivo per la luce di media intensità). Queste continue migrazioni comportano un notevole dispendio di energia e quindi di riserve nutritive, che portano ad una diminuzione del tempo di sopravvivenza delle larve (Soulsby, 1982).

*Trichostrongylus axei* presenta un ciclo analogo, anche se questo si sviluppa in tempi diversi: le uova, espulse all'esterno assieme alle feci dell'ospite, sviluppano la larva L1 nel giro di 2 giorni; questa schiude e raggiunge lo stadio di L3 in 4-5 giorni, inoltre risulta particolarmente resistente ai fattori ambientali avversi (Dietz e Wienser, 1984).

#### **2.4.2 Fase endogena del ciclo, grossi strongili**

##### *Strongylus vulgaris*

Le larve infestanti L3, dopo 1-3 giorni dall'ingestione, penetrano nella mucosa intestinale e in una settimana, a livello di sottomucosa, mutano al quarto stadio (L4). Successivamente le L4 superano la parete delle arteriole e, tramite il circolo ematico, raggiungono l'endotelio dell'arteria mesenterica craniale e delle sue principali diramazioni. Qui permangono per diversi mesi, durante i quali maturano al quinto stadio larvale (L5) e, per via arteriosa, tornano alla sottomucosa di cieco e colon e, una volta divenute adulte, si fissano saldamente alla mucosa.

La conferma di tale ciclo si è avuta infestando sperimentalmente, mediante l'utilizzo di una sonda gastrica, 3 ponies di 3-4 mesi con 750 larve di *S. vulgaris*.

Il periodo di prepatenza è stato stimato di 6-7 mesi, visto che i puledri risultavano positivi all'esame coprologico dopo 23-26 settimane (Poynter, 1970).

Il ciclo di *S. vulgaris* è, pertanto, annuale: gli animali si infestano in tarda primavera e inizio estate e, durante la stagione autunnale ed invernale, si ha l'evoluzione del parassita a livello di sistema arterioso intestinale dell'ospite. Il ciclo endogeno si conclude con l'emissione delle uova da parte dei soggetti adulti, nella primavera successiva.

Negli animali giovani si è riscontrata una maggior sensibilità all'infestazione: sembra, infatti, che dopo il primo contatto con il parassita si instauri una certa immunità, talvolta in grado di impedire ulteriori infestazioni o almeno a contenerle, limitando i danni per l'ospite (Duncan, 1974).

#### *Strongylus edentatus*

Le larve L3, ingerite dall'ospite, attraversano la parete dell'intestino crasso e tramite il circolo portale arrivano al fegato e a questo livello mutano a larve di quarto stadio (L4), dopo 11-18 giorni dall'infestazione (Dunn, 1969). Esse migrano nel parenchima epatico per 6-9 settimane, per poi raggiungere i legamenti epatici e il peritoneo, dove evolvono a larve di quinto stadio (L5).

Da qui, tramite il mesocolon, tornano alla parete del cieco e del colon, dove formano dei noduli emorragici che, rompendosi, liberano nel lume i parassiti adulti.

Tali noduli sono stati ritrovati anche in sede subpleurica (Marconcini e Macchioni, 1982) e scrotale, in cavalli criptorchidi (Smith, 1973).

Il periodo di prepatenza è di circa 10-12 mesi (Urquhart *et al.*, 1992).

#### *Strongylus equinus*

Le larve infestanti (L3), ingerite dall'ospite, penetrano nella mucosa del cieco e del colon, raggiungendo la sierosa, dove formano dei noduli, dentro i quali mutano ad L4 dopo circa 11 giorni dall'infestazione. Successivamente tali larve L4 abbandonano questi noduli e si dirigono verso il fegato, nel cui parenchima migrano per circa 4 mesi. La particolarità del ciclo di *S. equinus* sta nel fatto che le L4 passano dal fegato al pancreas, dove maturano a larve di quinto stadio (L5).

Queste tornano nuovamente al cieco e diventano parassiti adulti.

Il periodo di prepatenza è di 8-9 mesi (Urquhart *et al.*, 1992).

### **2.4.3 Fase endogena del ciclo, piccoli strongili**

#### Cyathostomini

La fase endogena ha inizio con l'ingestione delle larve infestanti che, a livello intestinale, si liberano del loro strato più superficiale, detto guaina, e si infiltrano nella mucosa intestinale.

Qui, sviluppandosi, si arrotolano su se stesse, formando dei caratteristici noduli.

Dopo 6-12 giorni dall'ingestione mutano in larve di quarto stadio (L4), raggiungendo la lunghezza di 3-5 mm, e si localizzano soprattutto nel cieco e nel colon dorsale (Reinemeyer, 1986).

Qui, nel lume, terminano il loro sviluppo mutando ad L5 e poi a parassita adulto dopo circa due mesi (Slocombe, 1985), ma questo periodo può essere prolungato da fenomeni di ipobiosi nella parete intestinale (Reinemeyer, 1986).

I piccoli strongili sono considerati meno patogeni rispetto ai grossi (Drudge e Lyons, 1986) poiché il parassita adulto vive libero nel lume del cieco (1%), del colon ventrale (55%) e dorsale (45%) e le larve compiono migrazioni brevi, solo all'interno delle pareti intestinali.

#### *Trichostrongilus axei*

Le larve infestanti (L3), una volta ingerite dall'ospite, si liberano della guaina esterna grazie alla produzione di enzimi, andando a localizzarsi a livello di ghiandole gastriche e nel primo tratto di intestino tenue. Gli adulti hanno una vita limitata, di 3-4 mesi, e depongono le uova a questo livello (Boch e Supperer, 1980).

Il periodo di prepatenza è di soli 20 giorni (Soulsby, 1982).

#### *Strongyloides westeri*

Gli adulti presenti nell'ospite sono rappresentati solo da femmine partenogeniche in grado di deporre uova embrionate che, talvolta, schiudono già in sede intestinale (Blood *et al.*, 1983). Le larve hanno un esofago di tipo rabditoide e nell'ambiente esterno possono trasformarsi in larve infestanti con esofago filiforme: questo ciclo è detto omogonico.

Esiste però anche un ciclo eterogonico del parassita, quando le larve si differenziano in maschi e femmine a vita libera; queste, nell'ambiente esterno, possono accoppiarsi e le femmine depongono uova da cui originano larve infestanti.

L'infestazione avviene per via orale, con l'assunzione di colostro o latte materno contaminati, o per via transcutanea.

In entrambi i casi le larve infestanti raggiungono per via ematica l'apparato respiratorio, in particolare i bronchi e i polmoni, per poi risalire verso la faringe ed essere deglutiti, giungendo nell'intestino tenue.

In questa sede le larve si sviluppano in femmine partenogeniche dopo 9 giorni dall'infestazione (Dietz e Wiesner, 1984).

Se l'ospite dimostra una certa risposta immunitaria, le larve di *S. westeri* si incistano nei muscoli e rimangono in ipobiosi, in attesa di un calo delle difese, come accade spesso nelle fattrici vicine al parto: nel momento del travaglio le larve raggiungono la mammella e, tramite il colostro prima e il latte poi, infestano il neonato. La presenza di larve nel latte dura almeno 15 giorni (Genchi e Malnati, 1976) e per alcuni Autori anche fino a 7 settimane dopo il parto, provocando sintomatologia enterica e diarroica nel puledro (Gagliardi, 1990). Il latte materno, quindi, costituisce la prima fonte di infestazione, a cui può sovrapporsi quella per via transcutanea (Lyons *et al.*, 1973). La strongiloidosi, infatti, è una parassitosi esclusiva degli animali giovani e in modo particolare dei puledri lattanti, estremamente sensibili e maggiormente esposti all'infestazione. Gli esami coprologici, eseguiti parallelamente su fattrici e puledri, hanno evidenziato differenti valori di positività tra le due categorie (Soulsby, 1982).

*Craterostomum spp.*

Il ciclo di sviluppo di questo piccolo strongilo è ancora poco conosciuto.

*Oesophagodontus robustus*

Il ciclo biologico di questa specie è del tutto sovrapponibile a quello dei Cyathostomini.

## **2.5 Epidemiologia**

Le strongilosi intestinali degli equidi sono parassitosi diffuse in tutto il mondo, soprattutto nelle regioni umide, e hanno carattere prevalentemente stagionale, anche se si riscontrano durante tutto l'arco dell'anno. Nei paesi con inverni freddi e/o estati calde la maggior presenza dei parassiti sui pascoli si ritrova tra l'estate e l'autunno.

L'andamento di queste parassitosi è tendenzialmente enzootico, ma può diventare epizootico in annate con clima particolarmente umido, che favorisce lo sviluppo larvale.

La categoria di animali più a rischio è quella dei puledri (Soulsby; 1982): la presenza delle uova nelle loro feci si nota sin dalle 7-8 settimane di vita, mentre nei soggetti

adulti si instaura una certa resistenza alla reinfestazione, anche se sicuramente alcuni di questi esemplari rappresentano una fonte di infestazione importante per i più giovani. E' stato stimato che un equino adulto può emettere con le proprie feci 1000 uova per grammo, per un totale di circa 30 milioni di uova al giorno (Soulsby; 1982). Il tipico comportamento dei cavalli, che sembrano continuamente esplorare l'ambiente con le labbra e la lingua, aumenta il rischio di ingerire elementi infestanti, sia per gli animali liberi che per quelli tenuti in scuderia.

Per impostare un piano di lotta efficace contro questi parassiti è importante conoscere i fattori epidemiologici che ne caratterizzano il ciclo e in particolare: il periodo favorevole allo sviluppo degli elminti, la densità degli animali al pascolo o nei paddocks, la possibile convivenza con altre specie ospite degli stessi parassiti, la promiscuità con altri equidi provenienti da zone diverse o non sottoposti ad adeguati controlli, l'azione delle condizioni climatiche sullo sviluppo dei parassiti.

Come già detto in precedenza, il ciclo degli strongili intestinali è di tipo diretto: le uova, espulse con le feci, maturano rapidamente e le larve infestanti (L3) si sviluppano in 6-8 giorni alla temperatura ottimale di 22-24°C ed umidità elevata (condizioni che si ritrovano in scuderie o box poco areati per buona parte dell'anno, con un minor effetto della stagionalità sullo sviluppo parassitario). Nonostante ciò l'animale che vive in box ha meno possibilità di infestarsi che non al pascolo, che rappresenta comunque l'ambiente ideale per lo sviluppo e la diffusione dei parassiti. Bisogna inoltre ricordare che le feci equine sono già di per sé un perfetto terreno di coltura in termini di umidità, aerazione e consistenza; ciò comporta che le larve possano svilupparsi su tutte le superfici, a patto che la temperatura non sia troppo bassa (Ambrosi, 1995).

Le larve sono dotate di una notevole motilità e vitalità e tendono a migrare dalle scie ad una qualsiasi zona di condensazione d'acqua (igrotropismo), sia che si tratti di manto erboso, di lettiera umida o di muri e pavimenti. Il grado di resistenza degli elementi infestanti nell'ambiente interno dei ricoveri varia in base alla frequenza di asportazione delle feci, del tipo di lettiera, della cura con cui è tenuta e dalla facilità con cui si formano zone di condensa sulle diverse superfici.

Nell'ambiente esterno le larve sono ovviamente favorite dall'umidità ambientale: resistono 5-6 settimane in estate e vari mesi nelle stagioni intermedie. In genere le forme larvali dei grossi strongili non passano l'inverno, mentre quelle dei piccoli

presentano una maggiore sopravvivenza alle basse temperature. Anche sui foraggi sfalciati esse hanno una maggiore resistenza rispetto a quelle dei grossi, che rimangono vitali per massimo 1-2 mesi. Ma molto dipende da come viene fatto essiccare il fieno: se il procedimento avviene sul campo le larve si allontanano dagli steli rapidamente, guidate da igro e geotropismo positivi, mentre se lo sfalciato viene subito posto sulle rastrelliere il rischio di conservare le larve è molto più elevato. Insilati e fieno accatastato, che sviluppano calore fermentando, difficilmente permettono la vita dei parassiti.

Il maggior numero di larve si localizza nelle parti inferiori degli steli d'erba, dove trovano condizioni più adeguate alla loro sopravvivenza, ma che sono più difficilmente raggiungibili dagli equidi, che si nutrono prevalentemente degli strati più superficiali dei vegetali. Ciò determina un aumento della percentuale di larve che muoiono per disseccamento o irradiazione solare. In aggiunta le larve più motili, pur contaminando un territorio ampio, esauriscono velocemente le riserve energetiche accumulate e resistono meno.

Il rischio maggiore di infestazione si ha durante la pascolata nelle prime ore del mattino o alla sera, quando la rugiada ricopre gli steli erbosi di un sottile strato di umidità oppure dopo una pioggia abbondante: si creano infatti le condizioni favorevoli per la migrazione delle larve dal terreno all'erba (igrotropismo).

Per quanto riguarda la concentrazione delle larve sui terreni di pascolo, come detto in precedenza, se ne riscontra un aumento durante i mesi estivi, quando le condizioni climatiche sono ottimali per la schiusa (Urquhart *et al.*, 1992).

Duncan (1974) ha rilevato nelle cavalle della Gran Bretagna un aumento dell'emissione di uova nelle feci in tarda primavera-inizio estate, che si riflette in alte concentrazioni di larve infestanti nei pascoli tra settembre ed ottobre. Con l'abbassarsi delle temperature cala anche l'emissione delle uova.

Come si evince da quanto sopra esposto, il principale fattore che influenza il numero di larve infestanti sui pascoli è la temperatura. Le basse temperature devitalizzano le larve libere e prolungano il tempo necessario per la loro maturazione a L3. Ovviamente tale periodo è decisamente più breve nei mesi caldi. Altri fattori che influenzano lo sviluppo e la sopravvivenza degli stadi larvali liberi sono rappresentati dalle caratteristiche delle feci, quali la tensione d'ossigeno e l'umidità, nonché il tipo

di superficie su cui ricadono. In estate le larve si sviluppano più rapidamente, ma meno del 10% raggiunge lo stadio infestante, mentre in primavera e autunno tale valore può arrivare all'80% (Colella *et al.*, 1988).

In genere gli episodi di strongilosi si hanno in tardo inverno o inizio primavera, in conseguenza dell'elevato numero di larve ingerite con il foraggio, al pascolo (Duncan, 1974 ; Genchi *et al.*, 1978). Di notevole pericolosità sono le sindromi primaverili, legate al risveglio delle larve ipobiotiche e all'attività di quelle assunte precocemente (Traldi *et al.*, 1988).

La stagionalità influenza anche la distribuzione dei parassiti e l'entità delle lesioni: le larve di *S. vulgaris* si localizzano nelle arterie mesenteriche prevalentemente tra febbraio ed aprile (Colella *et al.*, 1988) mentre, nei mesi più caldi, la presenza delle stesse nei vasi è minima poiché le larve infestanti, ingerite in questo periodo, andranno a localizzarsi nelle arterie solo dopo 3-4 mesi.

A causa del lungo periodo di prepatenza, i puledri infestati da *S. vulgaris* non iniziano ad emettere uova nelle feci prima dei 6-7 mesi d'età; quelle presenti già a 4-5 mesi appartengono, in genere, ai piccoli strongili (Slocombe, 1985). Se si trovano uova nelle feci di puledri di pochi giorni di vita è probabile che siano dovute a fenomeni di coprofagia (Soulsby, 1982). Per i neonati, nonostante possano infestarsi con larve che hanno svernato al pascolo, la principale fonte di infestazione rimane la madre, o altri cavalli adulti, nei quali si riscontra una maggiore emissione di uova nei mesi primaverili ed estivi. Nelle fattrici questo fenomeno potrebbe essere legato anche alla minor resistenza immunitaria che segue il parto e la lattazione. Invece, nei mesi che vanno da agosto a marzo, si assiste ad un graduale declino del loro numero.

Un aspetto epidemiologico importante, che rappresenta senza dubbio un rischio forte di contaminazione, è quello legato all'importazione di equidi sia per la macellazione che per l'attività sportiva: in questo modo spesso sono stati introdotti nel nostro Paese specie parassitarie di non comune riscontro, compresi ceppi farmacoresistenti (Traldi *et al.*, 1988). Ad esempio, su 101 capi importati, Colella *et al.* (1987) hanno riscontrato una positività con valori simili ai cavalli autoctoni per quanto riguarda i Cyathostomini (100%), *S. vulgaris* (82%) e *Triodontophorus* (21%), ma un'incidenza più elevata per quanto riguarda *S. equinus* (7%) e più bassa per *S. edentatus* (12%).

In genere le larve infestanti, ingerite durante l'estate, diventano elminti adulti nella primavera dell'anno successivo ed iniziano a produrre uova (Soulsby, 1982).

Ma vi è la possibilità che gli strongili intestinali possano sopravvivere da un anno all'altro per la capacità che hanno le larve dei Cyathostomini di cadere, nei periodi freddi, in uno stato di ipobiosi nella mucosa e sottomucosa dell'ospite, da cui escono solo al comparire di adeguate condizioni di temperatura ed umidità. L'ipobiosi rappresenta, quindi, uno stadio di quiescenza dell'elminta all'interno dell'ospite che gli permette di evitare condizioni ambientali avverse e di attendere il ripristino di quelle favorevoli, assicurandone la sopravvivenza. Si tratta di una parte del ciclo vitale non ancora ben chiara e studiata, tanto che gran parte dei meccanismi che la regolano sono sconosciuti. Per Lowe e Duncan (1988) l'ipobiosi potrebbe essere condizionata dall'immunità acquisita dell'ospite e della sua età. Secondo Slocombe (1985) tale fenomeno è stagionale, più marcato in autunno ed inverno e sembra che per i piccoli strongili possa protrarsi fino a 2 anni (Herd, 1986).

### **2.5.1 La situazione in Italia**

In Italia le infestazioni da grossi e piccoli strongili, tanto negli stalloni quanto nelle fattrici, presentano un incremento stagionale che inizia a maggio e raggiunge un picco tra giugno e luglio ( Genchi *et al.*,; 1978). Tuttavia, poiché le condizioni climatiche e ambientali del nostro Paese sono estremamente diversificate, è difficile dare delle informazioni di tipo epidemiologico che risultino valide per tutte le regioni. Ad esempio nel meridione, a causa del clima siccitoso che ne caratterizza le estati, sembra che il rischio maggiore di infestazione sia limitato al tardo autunno e inizio primavera (Colella *et al.*, 1988).

Come sottolineato nel capitolo relativo alla diffusione (2.3), la composizione delle specie di piccoli strongili è molto simile tra le varie regioni Italiane e in altri Paesi, indicando una certa stabilità nelle popolazioni di Cyathostomini. Tuttavia, delle differenze potrebbero essere legate a diversi sistemi di stabulazione, alla gestione e all'uso dei trattamenti antiparassitari. Inoltre, per alcuna specie, si può sospettare il fenomeno della farmacoresistenza, con conseguenti variazioni della distribuzione specie-specifica nelle diverse popolazioni (Pozzato, 2009).

## **2.6 Patogenesi e sintomatologia**

Le strongilosi intestinali degli equini sono caratterizzate da un'elevata polispecificità eziologica, tanto che è assai frequente la compresenza di più specie di strongili nello stesso ospite, sia grossi che piccoli (Ambrosi 1995).

Le principali azioni patogene di questi parassiti sono:

- 1- azione sottrattiva;
- 2- azione traumatica sui tessuti;
- 3- azione tossica;
- 4- azione foretica.

Da tutto questo derivano ripercussioni generali quali anemia, debilitazione e, nei casi più gravi, stati di cachessia. Tuttavia è facilmente intuibile come le diversità del ciclo endogeno tra grossi e piccoli strongili incidano sulla patogenicità delle diverse specie.

### **2.6.1 Grossi strongili**

Con questi parassiti è necessario distinguere in azioni patogene svolte dai parassiti adulti e dalle larve.

Gli adulti del genere *Strongylus*, come già riportato, vivono attaccati alla mucosa di cieco e colon, dove svolgono un'azione istofaga ed ematofaga (Soulsby, 1982) (Fig 4). A fronte di questo inducono lesioni locali, a livello del loro sito di attacco, che consistono in piccole ulcere emorragiche, in numero maggiore rispetto a quello degli elminti presenti e spesso confluenti, perchè essi migrano periodicamente verso nuove sedi di attacco. Tali ulcere, però, risultano più superficiali di quelle indotte dai parassiti del genere *Triodontophorus* che, in particolare per la specie *T. tenuicollis*, sono piuttosto profonde (Euzeby *et al.*, 1992).

Il frequente cambio di punti d'attacco alla mucosa provoca la formazione di lesioni beanti che danno facilmente luogo a complicanze batteriche e a processi necrotici, con marcata compromissione della funzionalità del grosso intestino (Ambrosi, 1995).

Nelle infestazioni più gravi è facile giungere ad una forte anemia, associata ad un aumento del catabolismo delle sieralbumine (Duncan, 1982).

Da un punto di vista clinico, in mancanza di quadri specifici, l'infestazione decorre cronicamente con deperimento, deficit di sviluppo muscolare nei giovani, feci irregolarmente pastose o diarroiche, lievi dolori colici ricorrenti, iporendimento fisico e soprattutto atletico. Frequente è la disoressia, anche se l'appetito può essere conservato, specialmente verso i cibi ricchi di proteine, con una compromissione molto limitata delle condizioni generali.

Nei casi più gravi, invece, è possibile riscontrare dimagrimento, anoressia, anemia grave e formazione di edemi discrasici nelle parti più declivi del corpo (Ambrosi, 1995).



**Fig. 4** Grosso strongilo attaccato alla mucosa intestinale.

[www.haflinger.it](http://www.haflinger.it)

Le larve del genere *Strongylus* sono responsabili di marcati effetti patogeni, che si possono differenziare a seconda delle diverse specie (Soulsby, 1982).

#### *Strongylus vulgaris*

Le lesioni causate dalla migrazione larvale provocano danni di diversa intensità. A livello di parete del grosso intestino esse sono legate alla penetrazione delle larve infestanti (L3) e alla loro migrazione nella sottomucosa (Ogbourne e Ducan, 1977). Le larve di quarto (L4) e quinto stadio (L5), invece, sono responsabili di gravi lesioni a livello di sistema arterioso enterico (Fig. 5) (Ogbourne e Ducan, 1977). Il danno maggiore si ha a carico dell'arteria mesenterica craniale (Poynter, 1990) dove, a seguito della loro azione meccanica, si verificano fenomeni di endo e periarterite, con conseguente formazione di trombi, sino al blocco della circolazione (Marcato, 1981; Ambrosi, 1995). Il processo infiammatorio, esteso ed irregolare, determina anche un indebolimento della parete vasale, con degenerazione delle fibre elastiche e

muscolari, a cui può conseguire una progressiva dilatazione (aneurisma), fino ad arrivare alla rottura della parete stessa, con un'emorragia interna spesso fatale (Soulsby, 1982; Ambrosi, 1995). Le masse trombotiche, che contengono un certo numero di parassiti, si possono disgregare e liberare piccoli emboli che, a loro volta, vanno ad occludere altri vasi, in particolare le diramazioni dell'arteria ileo-ciecale, dando ischemia, infarto intestinale (generalmente emorragico) ed enterite gangrenosa (Bennet, 1972; Soulsby, 1982; Ambrosi, 1995). La gravità dell'ischemia che colpisce l'intestino dipende anche dalla possibilità e dalla rapidità con cui si viene a creare un circolo collaterale nella zona colpita (Wright, 1977). In seguito all'arterite, inoltre, si possono creare stati di spasmo della parete arteriosa, con conseguente dolorabilità. L'ischemia e l'anossia della parete intestinale provocano a loro volta acidosi, con lesioni alle fibre nervose terminali (Greatorex, 1977) e compromissione dei gangli del plesso nervoso mesenterico (Ambrosi, 1995). A volte questi fenomeni possono arrivare ad interessare altri vasi di grossa importanza: il tronco brachiocefalico, con conseguenti effetti a livello cerebrale; l'arteria femorale e l'iliaca esterna, con alterazioni della deambulazione (la cosiddetta zoppicatura a caldo) (Ambrosi, 1995); le arterie spermatiche, che portano a fenomeni congestizi ed edematosi a livello testicolare (orchite verminosa) (Euzeby, 1963); l'aorta (Poynter, 1960; Euzeby, 1963; Romboli e Braca, 1978); le coronarie e le arterie renali (Poynter, 1960); le arterie epatiche (Euzeby, 1963; Soulsby, 1965; Patton e Drudge, 1977); le arterie polmonari (Euzeby, 1963; Patton e Drudge, 1977) con lesioni granulomatose in sede subpleurica.

Tuttavia, nella maggior parte dei casi, non si hanno evidenze cliniche perchè la localizzazione delle larve avviene in ramificazioni arteriose secondarie o riesce ad instaurarsi un circolo collaterale con effetto compensatorio (Ambrosi, 1995).

Il ruolo delle larve nelle coliche del cavallo è ancora molto discusso: in passato, quando la presenza dei grossi strongili era maggiore (Slocombe, 1985), oltre l'80% dei casi di colica sembravano derivare da danni provocati da *S. vulgaris*, e la colica tromboembolica era l'esito più frequente in caso di infestazione; Drudge (1979) riscontrò una riduzione dei casi di coliche laddove si esegua un serio programma di controllo della parassitosi.



**Fig. 5** Arterite provocata dalla migrazione delle larve di *S. vulgaris*.

© University of Liverpool

### *Strongylus equinus*

Le larve di *Strongylus equinus*, localizzate a livello di parenchima epatico e pancreatico, provocano la formazione di noduli che tendono a calcificare, ben visibili all'esame *post mortem*, tanto che il fegato assume un aspetto caratteristico, detto “a pallini di piombo” (Ambrosi, 1995). Talvolta le forme immature si possono localizzare sulle sierose e sul peritoneo, formando anche qui dei noduli che inducono fenomeni emorragici ed infiammatori anche gravi (Ambrosi, 1995).

Depressione e diarrea sono state riscontrate in puledri ponies con elevato numero di larve nel pancreas (Slocombe, 1985). Alcune lesioni si possono osservare anche in sedi erratiche, quali il diaframma e i polmoni (Slocombe, 1985).

### *Strongylus edentatus*

Anche le larve di questa specie si incistano a livello delle sierose, del peritoneo, del fegato e del pancreas e le azioni patogene sono sovrapponibili a quelle già descritte per *S. equinus*.

Il quadro clinico è invece caratterizzato da tensione addominale, segni evidenti di peritonite, disturbi motori, febbre, coliche, diarrea (Phillips e Kelveit, 1958; Ambrosi, 1995). Le lesioni, infatti, si localizzano prevalentemente a livello di peritoneo parietale, sono di natura irritativo-traumatica e possono dare sintomatologia acuta o subacuta. Quella acuta, però, è più rara ed è caratterizzata da raccolte ematiche contenenti larve immerse in un essudato siero-fibrinoso. Nelle forme subacute, più frequenti, si ritrovano noduli irregolari di colore rossastro, edematosi e rilevati, contenenti larve di quarto stadio e avvolti da grasso peritoneale (Marcato, 1981).

Forme erratiche di *S. edentatus* si possono ritrovare anche nei testicoli, soprattutto se ancora contenuti in cavità addominale: questi vanno incontro a fibrosi ipertrofica o, a seguito di una peritonite localizzata, si formano aderenze che ne impediscono la normale discesa (Euzeby, 1963).

### **2.6.2 Piccoli strongili**

La patogenicità delle forme adulte è legata all'elevato numero di parassiti presenti nel lume del grande intestino e della contemporanea presenza di più specie (Urquhart *et al.*, 1992). I parassiti adulti si nutrono di piccoli frammenti di mucosa e di contenuto intestinale, provocando lesioni di dimensioni microscopiche. Nei casi di imponenti infestazioni si possono riscontrare, però, seri danni tissutali a livello di mucosa, con conseguenti turbe digestive e assimilative nel grosso intestino. A partire da tali lesioni possono poi insorgere complicanze batteriche che esitano in una sindrome enterica caratterizzata da diarrea alternata a stipsi e feci ricoperte di muco (Soulsby, 1982; Blood *et al.*, 1983).

Le forme larvali, nella maggior parte delle specie, compiono il loro sviluppo all'interno della mucosa di cieco e colon, mentre alcune si sviluppano a livello di sottomucosa (Urquhart *et al.*, 1992). Le migrazioni di queste larve possono interessare anche l'intestino tenue dando lesioni che, nei casi più gravi, si estendono per tutta la sua lunghezza (Euzeby, 1963).

Nella mucosa e sottomucosa esse si arrotolano su se stesse formando numerosi noduli che vanno a comprimere le ghiandole intestinali, deformandone e restringendone il lume, con conseguente alterazione della secrezione (Euzeby, 1963). Nelle infestazioni più importanti, con la contemporanea presenza di elementi adulti e larve, si scatena un'enterite catarrale ed emorragica, con ispessimento della mucosa, soprattutto negli animali di età compresa tra i 6 mesi e i 3 anni. Le forme larvali possono quindi determinare una sindrome clinica nota come "Cyathostomiosi larvale" (Fig. 6), caratterizzata da un grave processo infiammatorio del grosso intestino, perdita di peso, diarrea, edema sottocutaneo, coliche e un tasso di mortalità superiore al 50% (Urquhart *et al.*, 1992).



**Fig. 6** Lesioni postmortem dovuti ad una Cyathostomiosi larvale.

©2009 Intervet International B.V.

### *Strongyloides westeri*

Come già precedentemente riportato, queste larve possono infestare i puledri tramite due vie: transcutanea e transmammaria (attraverso l'assunzione di colostro e latte). Nel primo caso le larve infestanti (L3) determinano lesioni a livello di cute degli arti e, in questo modo, favoriscono anche l'ingresso di altri patogeni quali, ad esempio, *Corynebacterium equi*, responsabile della polmonite dei puledri (Blood *et al.*, 1983). Il puledro, però, sviluppa una sufficiente immunità nei confronti del parassita sin dalla terza settimana dopo la nascita, che non origina problemi nell'adulto.

Attraverso la via mammaria, invece, le larve infestanti vengono ingerite con il latte materno e, a livello gastroenterico, provocano flogosi, atrofia dei villi e fenomeni diarroici (Drudge e Lyons, 1986).

### *Trichostrongylus axei*

L'infestazione da parte di questo parassita provoca una caratteristica perdita di peso improvvisa (Drudge e Lyons, 1986). Sia le larve che gli adulti si localizzano a livello di stomaco e non sempre rivestono un ruolo particolarmente patogeno (Ambrosi, 1995). Tuttavia, a causa dell'azione traumatico-meccanica svolta dalle larve durante la migrazione attraverso l'epitelio della mucosa gastrica, si instaurano quadri di gastrite acuta con iperemia, infiammazione catarrale e lesioni necrotiche; oppure gastrite cronica, proliferativa, con formazione di lesioni a cavolfiore nella mucosa gastrica stessa (Leland *et al.*, 1961; Ambrosi, 1995) e, nella porzione iniziale del duodeno, aree iperplastiche dall'aspetto polipoide (Slocombe, 1985). Tutto ciò ha come conseguenza turbe nell'assorbimento e nella digestione, con un drastico calo della produttività dell'animale.

## **2.7 Diagnosi**

### **2.7.1 Esami copromicroscopici qualitativi**

Comprendono una serie di esami svolti allo scopo di evidenziare la presenza di elementi parassitari quali uova, larve e oocisti. I principali sono:

#### **a) Esame microscopico diretto**

Mediante striscio su vetrino di una piccola quantità di feci e successiva osservazione al microscopio ottico. Questo tipo di metodica trova applicazione in quelle parassitosi caratterizzate da un alto numero di uova e/o oocisti, come le coccidiosi e le ascaridiosi.

#### **b) Esami per arricchimento**

Si tratta di metodiche che permettono di concentrare gli elementi parassitari mediante processi di sedimentazione o di flottazione.

- Esame di arricchimento per sedimentazione: si impiega come veicolo l'acqua; gli eventuali elementi parassitari si depositano sul fondo (con il tempo o mediante centrifugazione).
- Esame di arricchimento per flottazione: si impiega come veicolo una soluzione a densità superiore dell'acqua, ad alto peso specifico. Le uova o le oocisti, essendo più leggere, galleggiano e si portano in superficie. Le soluzioni più utilizzate sono:
  - soluzione satura di cloruro di sodio;
  - soluzione satura di solfato di magnesio;
  - soluzione al 33% di solfato di zinco;
  - soluzione “1300” di nitrato di sodio e zucchero (ottenuta miscelando 100c.c. d'acqua distillata con 540g di nitrato di sodio e 360g di zucchero);
  - soluzione “1350” di solfato di zinco (ottenuta miscelando 500 g di polvere di solfato di zinco in 500 ml di acqua distillata);
  - soluzione “1500” con iodomercurato di potassio (ottenuta mescolando 100 ml di soluzione di solfato di zinco e 16 ml di soluzione madre iodomercurata).

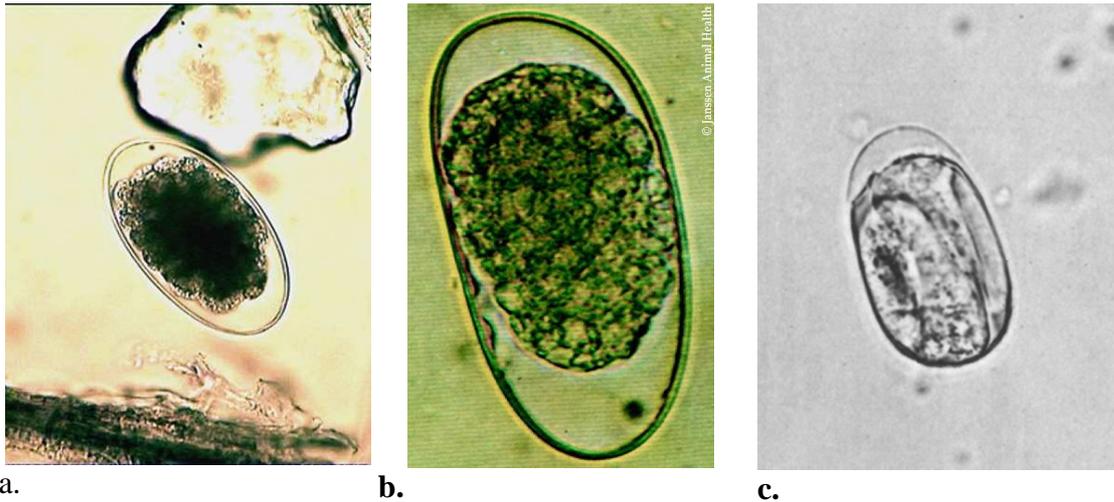
Queste soluzioni hanno un peso specifico diverso tra loro e sono generalmente usate in rapporto al tipo di indagine. Si utilizza un campione di feci, che viene stemperato in un mortaio assieme ad acqua di fonte, filtrato e immesso in una provetta per essere centrifugato una prima volta a 1500-2000 giri, per circa 3 minuti. Il surnatante così formato viene eliminato, mentre il sedimento rimane attaccato al fondo. L'operazione viene ripetuta varie volte, fino ad ottenere un surnatante limpido. A questo punto si versa sul sedimento una delle soluzioni ad alto peso specifico citate sopra e si sottopone la provetta ad un'ultima centrifugazione, sempre per 3 minuti. Al termine si aggiunge soluzione, fino ad ottenere un menisco che sporge dalla provetta, sul quale si adagia un vetrino coprioggetto dove, in pochi minuti, aderiranno gli elementi parassitari affiorati. Infine si appoggia tale vetrino su uno portaoggetto e si effettua la lettura al microscopio ottico (10x o 40x).

Una metodica molto usata, che comporta la sommatoria delle tecniche appena descritte, consiste in una filtrazione del materiale fecale attraverso dei setacci per allontanare il particolato più grossolano, seguita da una serie di lavaggi in calici conici in modo da ottenere un sedimento concentrato che verrà posto in provetta e addizionato con una soluzione ad alto peso specifico per permettere la flottazione delle uova.

Le uova degli strongili intestinali degli equini (Fig. 7) sono molto simili tra loro: presentano tutte forma ellittica od ovale, parete sottile, contenuto diafano, parzialmente riempito da blastomeri. Quelle dei piccoli strongili sono leggermente più grandi rispetto a quelle dei grossi strongili: le prime possono raggiungere una lunghezza pari a 100  $\mu\text{m}$ , mentre le seconde non superano gli 80-85  $\mu\text{m}$ ; tuttavia tale aspetto non costituisce una caratteristica sufficiente per l'identificazione dei vari generi.

Solo per *Strongiloides westeri* (Fig 7c) è possibile un'identificazione certa poiché le sue uova sono molto più piccole (30-40 micron) e la loro superficie spesso è deformata dalla presenza dell'embrione, che si sviluppa molto rapidamente, mentre ancora le uova si trovano nel lume intestinale dell'ospite.

Si rende quindi necessaria una coprocoltura, in seguito descritta, per distinguere tra piccoli e grossi strongili.



**Fig. 7** a. uovo di *Cyathostomum*, b. uovo di *Trichostrongylus*, c. uovo di *S. westeri*.

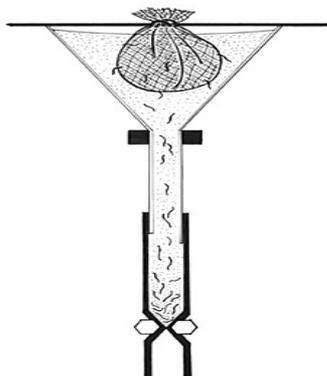
a. e c. ©Oklahoma State University

b. ©Jannes animal Health

### c) Tecniche di coprocultura

Lo scopo di tale procedura è quello di ottenere la schiusa delle uova contenute nel campione e l'evoluzione delle larve nella loro forma infestante (L3) mediante incubazione delle feci, per alcuni giorni, a condizioni di ossigenazione, temperatura ed umidità ottimali. Una quantità di materiale fecale di circa 40-50g viene accuratamente omogeneizzata, con l'uso di una spatola, a dell'acqua e granuli di argilla espansa, in modo che ne risulti una massa umida, non compatta e piuttosto permeabile all'aria.

Il materiale fecale viene incubato a 23-25°C per almeno una decina di giorni, mescolando regolarmente la massa per consentire una migliore ossigenazione.



**Fig. 8** Apparecchio di Baerman per la raccolta delle larve.

The RVC/FAO guide to Veterinary Diagnostic Parasitology.

Alla fine dell'incubazione le larve vengono raccolte, generalmente utilizzando il dispositivo di Baerman (Fig. 8), ed identificate al microscopio, in base alle loro caratteristiche morfologiche (Tab. 2).

Larva priva di guaina: *Strongyloides*

Larva con guaina:

**a.** coda corta (70-100 micron): *Trichostrongylus axei*

**b.** coda lunghissima e a frusta (>200 micron)

**b1.** 8 cellule intestinali: Cyathostomini

**b2.** 12 cellule intestinali: *Gyalocephalus capitatus*

**b3.** 16 cellule intestinali:

**b3.1** ben distinte:

- rettangolari, lunghezza tot. 1000 micron: *Poteriostomum*

- triangolari, lunghezza tot. 1000 micron: *Oesophagodontus robustus*

**b3.2** non ben definite, lunghezza tot. 1000 micron: *Strongylus equinus*

**b4.** 18-20 cellule intestinali:

**b4.1** ben distinte, rettangolari, esofago lungo: *Triodontophorus*

**b4.2** non ben definite, corpo snello, esofago corto: *Strongylus edentatus*

**b5.** 28-32 cellule intestinali, lunghezza totale > 1000 micron: *Strongylus vulgaris*

Tab. 2 Chiavi dicotomiche identificative per larve L3 di strongili intestinali degli equini (Ambrosi, 1995).

### 2.7.2 Esami copromicroscopici quantitativi

A differenza dell'esame qualitativo, quello quantitativo non consente solo di determinare la presenza di elementi parassitari ma anche di stabilirne il numero per grammo di feci. Purtroppo questo valore non è un buon indicatore della carica parassitaria individuale, poichè l'emissione di tali elementi parassitari nel tempo non è continua ed è influenzata da numerosi fattori, sia stagionali che giornalieri e, soprattutto, dallo stato immunitario dei soggetti, dall'età (Genchi e Sonzogni, 1979) e dal contenuto in acqua del materiale fecale (Sloss e Kemp, 1985). Maggiore è questo contenuto in acqua e minore sarà la quantità di uova reperite per unità di peso delle feci (per effetto di diluizione).

L'esame quantitativo può però fornire utili indicazioni sul grado di contaminazione ambientale e, di conseguenza, sui rischi di infestazione. Esso consiste nell'applicazione di tecniche particolari che permettono il conteggio degli elementi parassitari presenti nell'unità di peso delle feci, determinando valori espressi in u.p.g. (uova per grammo) oppure o.p.g. (oocisti per grammo).

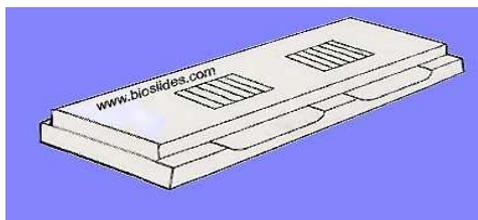
Per conteggiare tali elementi è utilizzata la camera di McMaster (fig. 9) formata da due vetrini sovrapposti e distanziati tra loro di 1,5 mm. Sul vetrino superiore si trovano disegnati due reticoli quadrati, ciascuno di 1cm x 1cm; di conseguenza il volume sottostante è complessivamente di 0,30 ml (Genchi e Sonzogni, 1979; Locatelli *et al.*, 1984).

Il materiale fecale è preparato per l'analisi nel modo seguente: 5g di feci vengono accuratamente stemperati in un mortaio con una soluzione ad alto peso specifico, sino ad ottenere una quantità di 30 ml. Questa sospensione viene travasata in una provetta graduata a chiusura ermetica ed agitata leggermente per renderla omogenea. Con una pipetta (utilizzando una garza come filtro, per allontanare le parti più grossolane) si preleva velocemente una quantità di liquido sufficiente per una camera di McMaster. Si appoggia la punta della pipetta in corrispondenza dell'intercapedine tra i due vetrini e si riempie lo spazio, avendo l'accortezza di non formare bolle d'aria. Dopo aver fatto riposare tutto per 2-3 minuti, in modo che le uova affiorino ed aderiscano al vetrino superiore, si passa all'osservazione con microscopio ottico (10x). Vengono contate tutte le uova racchiuse dal reticolo disegnato sul vetrino, ossia tutte quelle contenute nel volume di 0,30 ml (0,15 ml per ogni reticolo).

Mediante un semplice calcolo si può risalire al valore di uova per grammo di feci (u.p.g.): il numero di uova reperite in 0,30 ml rappresenta le centesima parte di quelle presenti nei 30 ml totali e quindi nei 5g di feci di partenza; per ottenere il valore di u.p.g. sarà pertanto necessario moltiplicare per 100 e dividere per 5, il che equivale a moltiplicare per 20.

La stessa metodica può essere utilizzata pesando 2 g di feci invece di 5 g. In tal caso, per ottenere il valore di u.p.g., basterà moltiplicare il numero di uova contate per 50.

Sebbene nel singolo individuo non vi sia nessuna correlazione tra il numero di uova per grammo di feci e la reale carica infestante, a livello di popolazione l'esame quantitativo può essere un valido indicatore di rischio parassitario. Risultano quindi importanti gli accertamenti quantitativi condotti su un numero significativo di soggetti all'interno dell'allevamento. Ad esempio: per le strongilosi intestinali degli equidi una media di allevamento superiore alle 1000 u.p.g. va considerata un indice di marcata, se non grave, infestazione; intorno alle 500-600 u.p.g. il grado di parassitosi è considerato sensibile; con 200 u.p.g. o meno si parla di bassa infestazione. Fanno eccezione i puledri lattanti o appena svezzati, dove la positività ha importanza, indipendentemente dal valore di u.p.g. (Ambrosi 1995). Data la caratteristica polispecificità degli strongili intestinali e delle diversità biologiche e patologiche, la diagnosi deve necessariamente mirare all'identificazione dei generi parassitari, mediante coprocoltura.



**Fig. 9** Camera di McMaster.

©Jannes animal Health

### **2.7.3 Limiti dei metodi diagnostici copromicroscopici**

I limiti della diagnostica coprologica possono essere schematizzati come segue:

1-limiti tecnici: i tempi di esecuzione sono piuttosto lunghi, soprattutto se si ricorre alla coprocoltura per una diagnosi qualitativa dettagliata.

2- Limiti fisiopatologici: la dispersione di uova nelle feci è influenzata da numerosi fattori, non ultimo il grado di funzionalità gastro-intestinale.

3-Limiti biologici: non si ha copropositività durante i periodi di prepatenza o di ipobiosi delle larve nei tessuti. Tale periodo di “silenzio coprologico” varia con la composizione della popolazione elmintica ed i fenomeni di resistenza naturale o acquisita dell'ospite.

Abbiamo poi da considerare la fertilità del parassita, che è influenzata da molteplici fattori:

- lo stato fisico del materiale fecale, come il contenuto in acqua che può più o meno diluire le uova;
- il genere parassitario, da cui dipendono la longevità e la prolificità del nematode adulto nel digerente dell'ospite;
- l'età e la situazione fisiologica dell'ospite, che incidono sul suo stato immunitario e ormonale.

## **2.8 Lotta alla parassitosi**

A causa della loro diffusione e dei danni legati all'azione patogena esercitata sia delle larve che dai parassiti adulti è indispensabile attuare accurati piani di controllo nei confronti delle principali parassitosi che interessano gli equidi. Per quanto riguarda le strongilosi intestinali degli equini, anche se queste raramente risultano fatali all'animale, possono danneggiare irreversibilmente il suo tratto gastroenterico e incidere sulla salute e le performance dello stesso, sia in termini di efficienza atletica, nel cavallo sportivo, che di incremento ponderale, nel cavallo da carne.

L'obiettivo principale dev'essere quello di ridurre al massimo la carica parassitaria e mantenerla tale: nella pratica, infatti, un'eradicazione completa ed un totale controllo di tali parassiti non sono possibili. Poiché i danni maggiori sono provocati dalla migrazione larvale, il primo intervento da mettere in atto sarà rivolto a ridurre il più

possibile il numero di larve infestanti presenti nell'ambiente in cui gli animali vivono. Questo risultato viene ottenuto attraverso interventi di bonifica ambientale e antiparassitari, due vie diverse ma complementari per attuare una lotta efficace.

### **2.8.1 Interventi ambientali**

Si tratta di misure igieniche atte a ridurre il numero di elementi parassitari nell'ambiente, associate a pratiche di allevamento che limitino l'esposizione dei cavalli al rischio di infestazione. Tali interventi ambientali possono essere svariati:

- Evitare il sovraffollamento di animali in pascoli e paddocks, così da non consentire l'instaurarsi di una concentrazione troppo elevata di uova e larve nell'ambiente (Euzeby, 1963). A tale proposito Drudge e Lyons (1986) hanno osservato che il rischio di infestazione in un paddock con 5 cavalli/acro è 25 volte superiore rispetto ad un paddock con un solo cavallo/acro.
- Igiene ambientale: l'obiettivo è quello di rendere l'ambiente inospitale allo sviluppo e alla sopravvivenza delle larve. Nei box è necessario rimuovere giornalmente le feci e rinnovare periodicamente la lettiera che, almeno in superficie, deve risultare sempre fresca ed asciutta. Quando essa viene asportata totalmente, sono necessarie pulizie e disinfezioni mediante lavaggi con soluzioni alcaline. E' importante che il locale sia correttamente areato, in modo da evitare l'aumento dell'umidità ambientale, in particolare a livello di pavimenti, muri o rastrelliere, dove possono migrare le larve. Inoltre bisogna evitare che i cavalli assumano gli alimenti direttamente dal terreno, per ridurre il rischio che ingeriscano L3. Mentre i cavalli adulti defecano in zone limitate e pascolano in quelle pulite, non si può dire lo stesso dei puledri che, oltretutto, hanno l'abitudine di ingerire le scie dei conspecifici, con un forte rischio di infestazione (Euzeby, 1963). Pertanto il materiale fecale dovrebbe essere asportato anche dai paddock esterni e dal pascolo due volte a settimana, pur essendo una pratica onerosa dal punto di vista della manodopera. Recentemente, in Texas, è stata realizzata una macchina a tale scopo, che riduce il letame in poltiglia, sviluppando un calore sufficiente ad uccidere le larve. Questa pratica ridurrebbe il numero di elementi infestanti in modo più efficace rispetto all'epicatura (Slocombe, 1988).

- Sfalcio dei prati e dei recinti con manto erboso: quando l'erba non è necessaria per la nutrizione degli animali dovrebbe essere falciata ed affienata frequentemente, creando condizioni microclimatiche sfavorevoli allo sviluppo delle larve infestanti sul terreno (Drudge e Lyons, 1986).
- Rotazione dei pascoli: i terreni su cui hanno pascolato i cavalli devono rimanere liberi per almeno 2-3 mesi ed essere ripopolati solo da animali trattati (Ambrosi, 1995). Tuttavia, secondo altri Autori, questa pratica avrebbe poca efficacia profilattica verso gli strongili intestinali degli equini, a differenza di come avviene nei bovini, a causa della maggior resistenza che le larve di questi parassiti hanno nell'ambiente.
- Rotazione di animali appartenenti a specie diverse: alternando al pascolo la presenza di bovini ed equini, ad esempio, si riduce fortemente il rischio di infestazione, essendo impossibile la trasmissione interspecifica di questi parassiti, fatta eccezione per *Trichostrongylus axei* (Drudge e Lyons, 1986). I ruminanti non sono ospiti recettivi per gli strongili intestinali degli equidi quindi, ingerendo le larve ne riducono il numero, senza che poi queste possano svilupparsi nell'ospite ruminante.
- Sistematica erpicatura dei pascoli: questa tecnica viene usata per esporre i parassiti all'azione dannosa del sole, facendo in modo che si disidratino (Drudge e Lyons, 1986). Per completare l'opera di risanamento, una volta che gli animali vengono spostati dal pascolo, si potrebbe procedere alla concimazione con calciocianamide (meglio se in polvere).
- Controllo della percentuale di umidità del fieno: è opportuno che al momento della raccolta l'umidità sia sufficientemente elevata da permettere alla massa erbosa di fermentare e raggiungere una temperatura di circa 50°C, con conseguente morte delle larve, che altrimenti rimarrebbero vitali per circa sei mesi (Gagliardi, 1990).
- Applicazione di finimenti o "harness": questi hanno lo scopo di raccogliere le feci, permettendo una minor contaminazione ambientale. Ma si tratta di attrezzature costose e soprattutto scomode ed ingombranti per il cavallo.
- Cura della concimaia: essa dovrebbe essere posta in un'area isolata o recintata, evitando soprattutto la contaminazione delle acque destinate al pascolo. E' importante che il letame raggiunga un'elevata temperatura, dovuta

alle fermentazioni (di norma non può essere utilizzato che dopo almeno una settimana di maturazione (Gagliardi, 1990)). In assenza di una concimaia le feci dovrebbero essere accatastate e coperte di terra per favorire il raggiungimento di temperature adeguate a devitalizzare le larve.

- Alimentazione dell'animale: è un fattore molto importante perchè, se corretta, consente al cavallo di opporre una certa resistenza ai parassiti (Blood *et al.*, 1983).

### **2.8.2 Interventi farmacologici**

Si basano sull'adozione di un programma di interventi gestionali e terapeutici che mirano a garantire la salute dell'animale e a diminuire il grado di contaminazione ambientale.

Le dosi e le modalità di assunzione di farmaci antielmintici cambiano in funzione del principio attivo. Fino agli anni '60, quando erano disponibili solo fenotiazina, piperazina e disolfuro di carbonio, la loro somministrazione richiedeva l'utilizzo di sonde gastriche, pratica scomoda e mal accettata dall'animale.

Attualmente gli antiparassitari vengono formulati in pasta o gel, da assumere per via orale, oppure polveri o prodotti granulari da aggiungere all'alimento. Con i farmaci in pasta o gel è possibile somministrare il principio attivo rapidamente e nel giusto dosaggio, grazie all'utilizzo di apposite siringhe dosatrici; gli animali oppongono scarsa resistenza e i rischi per l'operatore e il cavallo sono minimi. Poiché un eccesso di saliva o la presenza di cibo ne possono ostacolare l'assunzione, sarebbe opportuno assicurarsi che la bocca del cavallo sia vuota e depositare il farmaco sulla lingua, facendo passare il dosatore attraverso le barre. Queste formulazioni hanno soppiantato anche quelle per via parenterale, che potevano dare reazioni nella zona di inoculo (Drudge e Lyons, 1986). Gli strongili intestinali degli equini hanno sensibilità diverse agli antielmintici, e ciò influenza il successo o meno del trattamento: ad esempio *S. vulgaris* e *S. equinus* sono di norma più resistenti rispetto a *S. edentatus* (Drudge e Lyons, 1986).

La frequenza dei trattamenti viene scelta in base ai tempi che caratterizzano il ciclo biologico del parassita. Infatti, se per debellare i grossi strongili viene consigliato un trattamento ogni 2-3 mesi, per i piccoli strongili, avendo essi una fase endogena più

breve, sarebbe richiesto un trattamento addirittura ogni 4-6 settimane. Secondo alcuni Autori americani, però, dovrebbe essere sufficiente un intervento ogni 8 settimane, visto che le uova dei cyathostomini ricompaiono nelle feci a partire dalla quinta o sesta settimana dopo la somministrazione. L'intervento chemioterapico, inoltre, dovrebbe essere attuato in conformità all'età e all'attività svolta dell'equide (Traldi *et al*, 1988).

Alcuni Autori suggeriscono l'opportunità di effettuare terapie più frequenti nei puledri e un trattamento primaverile-estivo per le giumente (Herd e Gabel, 1990). Tuttavia, è indispensabile sottolineare che un piano di controllo basato esclusivamente sulla somministrazione frequente di antielmintici espone maggiormente al rischio di selezionare ceppi di strongili intestinali chemioresistenti ed è pertanto sconsigliato.

I trattamenti possono essere attuati in due modi: strategico o tattico. Il primo prevede di intervenire con i farmaci sempre negli stessi periodi dell'anno e nella stessa fase del programma di intervento, per eliminare i parassiti (effetto terapeutico) e ridurre la contaminazione dei pascoli (effetto profilattico). Il secondo, che spesso si affianca al precedente, viene utilizzato per gli animali al pascolo, quando le condizioni climatiche tendono a favorire lo sviluppo larvale e la loro assunzione: per esempio stagioni miti e particolarmente piovose; oppure quando animali provenienti da un ambiente a basso grado di infestazione vengono introdotti in un'area ad alto rischio (Blood *et al*, 1983).

Negli ultimi anni, però, si sta prendendo in considerazione l'idea di non trattare tutti gli animali presenti, ma attuare “trattamenti selettivi” che, a seguito di accertamenti copromicroscopici, prevedono di somministrare gli antielmintici solo agli animali positivi ai test o, meglio ancora, solo ai forti eliminatori (valori u.p.g > 150). In questo modo sembra che si riesca comunque a tenere sotto controllo la diffusione dei parassiti (Matthews, 2008), limitando la pressione selettiva verso ceppi di Cyathostomini resistenti e preservando l'attività delle molecole ancora efficaci.

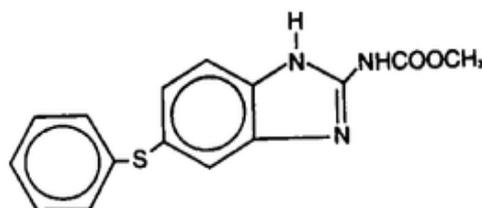
I farmaci antielmintici comprendono diverse famiglie di molecole accomunabili fra loro sulla base del meccanismo con cui agiscono sulle interazioni neuromuscolari (mimando l'azione di neurotrasmettitori (azione diretta) o inibendo la normale formazione e degradazione di tali sostanze (azione indiretta)), oppure interrompendo

i processi metabolici ed energetici del parassita. I nematodi possiedono una muscolatura striatiforme, più facilmente eccitabile rispetto a quella dei mammiferi, visto che il potenziale di riposo ha valori di -30 mV. La fibra nervosa, nella sua parte terminale, viene racchiusa a guisa di involucro dalla muscolatura, senza la presenza di una placca neuromuscolare. I principali neurotrasmettitori sono: acetilcolina, ad azione eccitatoria, e l'acido  $\gamma$ -aminobutirrico (GABA), ad azione inibitoria. Il loro metabolismo è quasi esclusivamente di tipo anerobio, basato sull'utilizzo del glucosio come fonte energetica.

I principi attivi più utilizzati sono sicuramente quattro: fenbendazolo, moxidectina, ivermectina e pyrantel pamoato. Qui verranno trattati più diffusamente i primi due, essendo i farmaci utilizzati nella parte sperimentale di tale lavoro.

1- **Fenbendazolo:** fa parte della categoria dei probenzimidazoli (Fig. 10), sintetizzati a partire dai benzimidazoli. Nello specifico il fenbendazolo deriva dalla bioattivazione ossidativa del febantel. E' efficace nei confronti delle forme adulte di grossi e piccoli strongili intestinali, di *Trichostrongylus axei*, degli ossiuri e limitatamente contro gli ascaridi e le forme immature degli ossiuri. Esso viene assorbito rapidamente (a differenza dei benzimidazoli) e in modo incompleto a livello intestinale; va incontro ad una veloce attivazione e raggiunge solo tardivamente alte concentrazioni a livello ematico. Il meccanismo d'azione di questa classe di farmaci consiste nel legarsi con la forma dimera della tubulina dei nematodi, proteina strutturale essenziale, impedendo la formazione dei microtubuli. Questo, a livello delle cellule intestinali degli elminti, blocca l'assorbimento del glucosio, con conseguente morte del parassita. Anche se quello appena descritto risulta essere il loro principale meccanismo d'azione, come dimostrato dal fatto che l'instaurarsi di fenomeni di resistenza implica proprio una ridotta affinità di legame tra farmaco e proteina, sembra non sia l'unico. Abbiamo anche una certa inibizione della fumarato-reduttasi mitocondriale e un'azione di disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa, andando a bloccare la trasformazione di glucosio in energia vitale.

Viene somministrato generalmente come pasta orale ad un dosaggio di 7,5 mg/kg. Per uccidere le larve di III (incluse quelle precoci o in ipobiosi) e IV stadio dei piccoli strongili, incistate nella mucosa, viene consigliato di ripetere il dosaggio singolo per 5 giorni consecutivi (Di Pietro *et al.*, 1997). Pur essendo farmaci piuttosto maneggevoli, sembra possano provocare una certa irritazione a livello gastro-enterico, con fenomeni di diarrea. Se ne sconsiglia l'uso in fattrici gravide, per gli effetti embriotossici che possono avere alcuni loro metaboliti (albendazolo e oxfendazolo), e in stalloni durante il periodo di monta, in quanto può diminuire le performance riproduttive. Tuttavia il problema principale di questi farmaci sembra correlato all'insorgenza di fenomeni di resistenza, anche di tipo crociato (vedi capitolo 2.8.3).



**Fig. 10** Struttura chimica del fenbendazolo.

Copyright 2010©ChemicalBook.

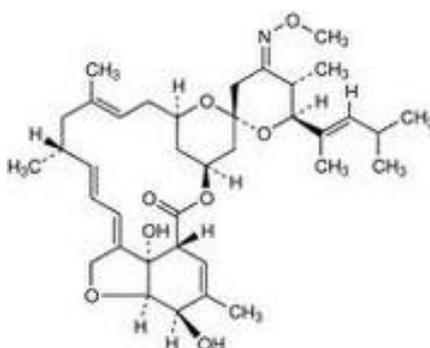
2- **Moxidectina:** appartiene alla famiglia dei lattoni macrociclici e rientra nella classe delle milbemicine (Fig. 11). E' un derivato di semisintesi della nemadectina, prodotta per fermentazione da *Streptomyces cyaneogriseus noncyaneogriseus*. E' attiva nei confronti dei nematodi, comprese le larve di IV stadio di piccoli strongili e *S. vulgaris* e degli artropodi; per questo prende il nome di "endectocida". Non ha invece efficacia su cestodi, trematodi e protozoi. Sembra che questo farmaco non sia attivo nemmeno sulle larve di III stadio dei piccoli strongili, soprattutto quelle più precoci (Xaio *et al.*, 1994; Eysker *et al.*, 1997).

Le sue caratteristiche di lipofilità fanno in modo che essa si distribuisca bene a tutti i tessuti e si depositi in quello adiposo (soprattutto a livello di grasso addominale e sottocutaneo) e permanga a lungo nell'organismo. Essa, inoltre, è caratterizzata da una prolungata emivita e un'attività residua significativa. L'eliminazione avviene prevalentemente per via fecale, fino al 77%, sotto forma di composto parentale attivo, senza quindi che si formino alte quantità di metaboliti meno attivi.

La moxidectina è diversa dagli altri lattoni macrociclici perchè rappresenta un substrato meno idoneo per la glicoproteina-P. Essa è una pompa di membrana che riesce ad eliminare numerose sostanze lipofile dalle cellule del parassita. Tutte queste caratteristiche fanno in modo che la frequenza dei trattamenti antiparassitari sia minore, riducendo la pressione selettiva verso ceppi farmacoresistenti (vedi capitolo 2.8.3) (Cobb e Boeckh, 2009).

La sua azione si esercita a livello di sinapsi nervose tra interneuroni e neuroni motori eccitatori, per quanto riguarda i nematodi; negli artropodi (*Gasterophilus* spp. nel cavallo) agisce a livello di giunzione neuromuscolare. In entrambi i siti, però, l'effetto è il medesimo: determina l'apertura dei canali per il cloro non GABA dipendenti, legandosi ad essi in modo irreversibile e con alta affinità. L'elettrolita è così libero di entrare nella cellula, provocando un'iperpolarizzazione a livello di membrana post sinaptica. In questo modo viene impedita la trasmissione dell'impulso e si ha una paralisi flaccida del parassita, che muore e/o viene facilmente espulso. Questa classe di farmaci si lega anche ai canali per il cloro GABA dipendenti, ma con un'affinità circa 100 volte inferiore e in modo reversibile. Questi recettori per i lattoni macrociclici sono specifici degli invertebrati, rendendo i farmaci sicuri per l'animale trattato, ma non sono presenti nei protozoi e nei plattelminti, spiegando l'inefficacia del trattamento nei confronti di tali parassiti. Inoltre la tossicità di questa classe di farmaci sembra legata più che altro alla loro capacità di essere trasportati dalla glicoproteina-P in siti a rischio, soprattutto a livello di sistema nervoso centrale. Vista la minor affinità della moxidectina nei confronti di tale pompa di membrana, essa risulta più sicura rispetto agli altri endectocidi (Cobb e Boeckh, 2009).

Viene somministrata in pasta orale ad un dosaggio di 0,4 mg/kg.



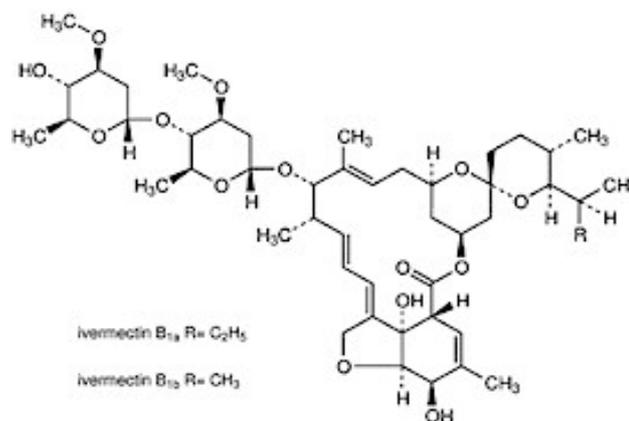
**Fig. 11** Struttura chimica della moxidectina

Copyright 2010©ChemicalBook.

3- **Ivermectina:** avermectina della famiglia dei lattoni macrociclici, anch'essa un endectocida (Fig. 12). Deriva dalla modificazione del prodotto di fermentazione di *Streptomyces avermitilis*. Meccanismo e spettro d'azione sono sovrapponibili a quello della moxidectina.

E' un composto molto lipofilo, rapidamente assorbito e distribuito in tutto l'organismo; subisce un'estesa metabolizzazione epatica e viene escreto con le feci.

Negli equidi viene utilizzata in un'unica somministrazione, come pasta orale, alla dose di 0,2 mg/kg.

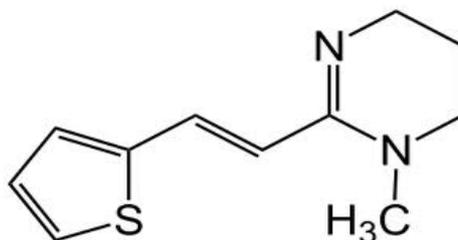


**Fig. 12** Struttura chimica dell'ivermectina.

Copyright 2010©ChemicalBook.

4- **Pyrantel pamoato:** derivato imidazolico della famiglia delle tetraidropirimidine (Fig. 13). E' efficace sulla maggior parte degli strongili gastro-intestinali degli equini, comprese larve di IV stadio, sugli ossiuri e su primi stadi larvali e forme mature di *Parascaris equorum*. Questo farmaco, provocando la depolimerizzazione degli agenti bloccanti la depolarizzazione a livello delle giunture neuromuscolari, dà contrattura permanente e conseguente paralisi spastica del parassita. Il sale pamoato, meno idrosolubile delle altre formulazioni, è particolarmente adatto al trattamento delle infestazioni intestinali; viene eliminato per via fecale. Questo farmaco è sconsigliato in animali gravemente debilitati o che stanno assumendo farmaci colinergici perchè si possono avere pronunciati effetti muscarinici, che in animali sani non si presentano, se non a dosi 20 volte superiori a quelle consigliate.

Può venir somministrato sotto forma di pasta orale o polvere da aggiungere all'alimento di cavalli e ponies ad una dose di 6,6 mg/kg.



**Fig. 13** Struttura chimica del pyrantel.

Copyright 2010©ChemicalBook.

Relativamente agli interventi farmacologici applicati nel controllo delle infestazioni da piccoli strongili, è importante valutare l'azione delle diverse molecole nei confronti dei vari stadi di sviluppo di questi parassiti (tab. 3 e 4), nonché degli effetti che alcuni principi attivi (in particolare il fenbendazolo) possono comportare a livello di parete intestinale uccidendo le larve ma causando danni tissutali che “mimano” una cyathostomiosi larvale (Steinbach 2006) (tab. 4).

	<i>Fenbendazolo</i>	<i>Moxidectina</i>	<i>Ivermectina</i>	<i>Pyrantel</i>
<i>Adulti</i>	◆	◆	◆	◆
<i>Larve libere nel lume intestinale</i>	◆	◆	◆	
<i>Larve incistate</i>	◆	◆		
<i>Efficacia su ceppi resistenti ai benzimidazolici</i>		◆	◆	◆

**Tab. 3** Azione dei principi attivi sui piccoli strongili intestinali, nei loro diversi stadi di sviluppo.

	<i>Moxidectina</i>	<i>Fenbendazolo</i>
<i>Efficacia sulle larve incistate</i>	Si (dose singola)	Si (dose singola per 5 gg)
<i>Effetti sulla parete intestinale</i>	Larve uccise in situ (Reinemayer, 2003) e riassorbite senza causare infiammazione severa della parete (Steinbach, 2006)	Larve uccise in situ causando un danno tissutale che mima una Cyathostominosi larvale (Steinbach 2006).
<i>Resistenza (UK e Irlanda)</i>	Non confermata	Confermata (Fisher <i>et al.</i> , 1992)
<i>Possibilità di controllare ceppi resistenti ai benzimidazolici</i>	Si	No
<i>Utilizzo dove la resistenza ai benzimidazolici è accertata</i>	Si	No (Coles <i>et al.</i> , 2003), può favorire la selezione di ulteriori ceppi resistenti (Reinemeyer <i>et al.</i> , 2003)

**Tab. 4** Confronto tra Fenbendazolo e Moxidectina nel controllo delle larve di piccoli strongili gastrointestinali incistate nella parete intestinale.

Nonostante moxidectina (in singola dose) e fenbendazolo (in dose singola per 5 giorni) sembrano risultare ugualmente efficaci sulle larve incistate di piccoli strongili intestinali, c'è una sostanziale differenza sul grado di infiammazione provocato dai due farmaci a livello di mucosa. Istologicamente si è visto che, utilizzando il fenbendazolo, i linfociti T si accumulano attorno alla larva intatta, formando, assieme agli eosinofili, un granuloma. Il processo infiammatorio si estende alle porzioni di mucosa circostante e si associa a ulcere. Con la moxidectina, invece, non sono state osservate alterazioni morfologiche a livello mucosale. Le larve vengono uccise, distrutte e riassorbite senza che si formino severe reazioni infiammatorie (Steinbach *et al.*, 2006). Studi condotti in medicina umana hanno dimostrato come i probenzimidazolici siano in grado di stimolare la produzione di citochine proinfiammatorie (interleukina-8, tumor necrosis factor- $\alpha$ ) da parte di monociti e macrofagi, soprattutto i T-helper 1 (Katsuhiko *et al.*, 2010). In un'altra sperimentazione condotta su topi usati come modello per l'asma umana si è visto come l'aggiunta di fenbendazolo nel cibo diminuisca l'eosinofilia a livello polmonare

e la produzione di citochine e IgG da parte dei Th2, rivelando, anche in questo caso, un effetto di immuno-modulazione da parte del farmaco (Cai, Zhou e Webb, 2009).

Tenendo conto di quanto sopra esposto e delle numerose variabili in grado di influenzare la frequenza e il momento adatto al trattamento (numero di cavalli presenti, ampiezza del pascolo, clima, situazione epidemiologica, specie parassitarie presenti, efficacia del principio attivo su larve e adulti, ecc.) è possibile definire, sempre a fronte di accertamenti coprologici, un calendario di interventi da seguire nelle varie categorie animali.

#### a) Trattamento delle fattrici

Considerando che il picco di emissione delle uova si verifica generalmente in primavera (a seguito dell'infestazione dell'anno precedente) ed in autunno (se è avvenuta un'infestazione in primavera), è opportuno fare 4 trattamenti: in marzo, maggio, luglio e settembre. Eventuali interventi intermedi possono rendersi necessari in caso di particolari condizioni climatiche o sanitarie, come elevate piovosità, debilitazione dell'animale, introduzione di nuovi soggetti, ecc.

Le fattrici devono essere attentamente monitorate (Taldi *et al.*, 1988), in quanto sono le maggiori responsabili dell'infestazione del puledro, già nei primi giorni di vita. Se il parto avviene prima di marzo sarà necessario trattare le fattrici entro gli ultimi 15 giorni di gravidanza.

#### b) Trattamento dei puledri

Il primo intervento viene effettuato all'età di 2-3 mesi, mentre i successivi in concomitanza di quelli fatti alla madre. Ad esempio: un puledro che nasce in marzo sarà trattato per la prima volta a maggio, successivamente a luglio e poi a settembre; se il puledro nasce in aprile il primo trattamento sarà fatto a luglio e il successivo a settembre-ottobre.

Un'altra somministrazione di antielmintico dovrebbe coincidere con lo svezzamento o, comunque, in prossimità di esso. Il puledro di due anni viene trattato ogni 2-3 mesi a partire da febbraio-marzo.

#### c) Trattamento dei cavalli sportivi

Vanno trattati come minimo due volte l'anno, in primavera ed in autunno. Se, durante l'interruzione dell'attività agonistica, sono mandati al pascolo, sarà opportuno trattarli anche alla fine di tale periodo.

Per facilitare il management si può seguire lo schema improntato per le fattrici. In ogni caso esami coprologici di routine dovrebbero essere utilizzati almeno 2 volte l'anno: uno prima del trattamento da fare a marzo (il primo dell'anno) e il secondo fatto 2 mesi dopo il trattamento autunnale. In base ai risultati degli esami si può decidere se continuare con gli stessi trattamenti strategici o se diviene necessario cambiare prodotti e/o tempi di somministrazione.

#### d) Trattamento degli stalloni

Il trattamento va effettuato 2 volte l'anno, in primavera ed in autunno.

#### e) Trattamento dei cavalli di nuova introduzione

Il trattamento va eseguito in modo mirato, a seguito di esami copromicroscopici.

Riassumendo, i fattori da prendere in considerazione per la scelta del farmaco sono diversi:

- grado di efficacia nei confronti delle specie parassitarie presenti;
- eventuale azione larvicida;
- tossicità;
- praticità di somministrazione;
- fenomeni di farmacoresistenza;
- costo;

### **2.8.3 Chemioresistenza**

La chemioresistenza agli antelmintici è un fenomeno complesso, che coinvolge numerosi aspetti riguardanti la specie parassitaria, l'ospite, la molecola usata per il trattamento e il corretto uso del farmaco (soprattutto sottodosaggi e/o usi troppo frequenti). Esso accomuna molecole con uguale meccanismo d'azione, con la possibilità di avere resistenze crociate a più farmaci.

I trattamenti antielmintici messi in atto a partire dagli anni '60 sono stati studiati per controllare prevalentemente le infestazioni da grossi strongili, ritenuti una delle principali cause di colica nel cavallo (il più utilizzato era l'interval dose system, che prevedeva di somministrare antielmintici ogni 6-8 settimane) (Drudge *et al.*, 1966). Come già accennato, tali protocolli si sono rivelati molto efficienti ma, parallelamente, hanno portato ad un aumento della presenza dei piccoli strongili intestinali e alla selezione di ceppi farmacoresistenti. A fronte di questo cambiamento nella diffusione di piccoli e grossi strongili, nella pratica quotidiana non c'è stato un sensibile adeguamento dei modi e dei tempi di trattamento; inoltre i farmaci vengono somministrati soprattutto a “scopo preventivo”, senza l'ausilio di accertamenti copromicroscopici.

I piccoli strongili intestinali (Strongylida, Cyathostominae) sono stati fatti oggetto, negli ultimi anni, di numerosi studi relativi alla farmacoresistenza: è stato riscontrato un sensibile aumento delle popolazioni resistenti a farmaci benzimidazolici e alle tetraidropirimidine.

Tale resistenza ai benzimidazoli viene accertata tramite il calcolo della Fecal Egg Count Reduction (FECR-test in vivo), a partire dalle analisi copromicroscopiche volte a determinare il numero di uova per grammo (u.p.g.) pre (giorno 0) e post trattamento (giorno +14). Essa rappresenta il gold standard e valori (*cut off*) < 90% sono già considerati indicativi di resistenza (Bauer *et al.*, 1986). Tuttavia, ancora oggi, per la specie equina non esistono delle specifiche linee guida della W.A.A.V.P. (World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology) per valutare in vivo la resistenza di nematodi di importanza veterinaria, a differenza di quanto accade per altre specie (in particolare ovina e caprina). Non esistono infatti indicazioni precise sul numero di cavalli da utilizzare nelle prove in vivo e sul *cut off* da tenere in considerazione. Un secondo riferimento è il calcolo della dose letale 50 (DL<sub>50</sub>) e della dose letale 96 (DL<sub>96</sub>) sulle larve ottenute mediante test di schiusa delle uova (EHT): un valore di DL<sub>50</sub> > 0,1 mg/ml di thiabendazolo (Whitlock *et al.*, 1980; Kelly *et al.*, 1981; Coles *et al.*, 1992) e di DL<sub>96</sub> > 0,15mg/ml di thiabendazolo (Ullrich *et al.*, 1988) sono legati a fenomeni di resistenza. Negli ultimi anni le ricerche si sono concentrate sul polimorfismo del codone 200 del gene che codifica per la β-tubulina: si è visto che i ceppi di *Trichostrongylus* resistenti delle pecore mostravano una mutazione puntiforme dove una fenilalanina viene sostituita da una

tirosina, con un genotipo omozigote tyr/tyr (Kwa *et al.*, 1994; Elard *et al.*, 1999). Usando PCR allele-specifiche si è notato che questo polimorfismo nel codone 200 è presente anche nel DNA degli strongili, ma il genotipo omozigote tyr/tyr non sembra essere predominante nei ceppi farmacoresistenti (Pape *et al.*, 2003; Drogemuller *et al.*, 2004). Ciò fa pensare che, nonostante il polimorfismo del codone 200 della  $\beta$ -tubulina sia coinvolto, esso non sia il solo o il predominante meccanismo su cui si basa la resistenza del parassita (Drogemuller *et al.*, 2004). In tale fenomeno potrebbero essere implicati altri polimorfismi a carico della  $\beta$ -tubulina, la delezione di geni che conferiscono suscettibilità al farmaco (Kwa *et al.*, 1993) o un meccanismo legato al trasporto da parte della glicoproteina-P (Nare *et al.*, 1994). Si pensa che anche l'uso delle fenotiazine abbia contribuito a preselezionare ceppi resistenti al fenbendazolo (Drudge, Lyon *et al.*, 1990). Questi due farmaci, infatti, agiscono entrambi inibendo la formazione dei microtubuli nelle cellule del parassita (Rew e Fetterer, 1986).

Anche la resistenza nei confronti dei tetaidropirimidinici è confermata da anni in più Paesi come Stati Uniti (Chapmann *et al.*, 1996; Woods *et al.*, 1998; Lyon, Tolliver, Drudge *et al.*, 2001; Tarigo-Martinie *et al.*, 2001), Norvegia (Ihler, 1995) e Danimarca (Craven *et al.*, 1998). Si pensa che la spinta selettiva verso ceppi di strongili resistenti sia da imputare all'uso di basse dosi (2,64 mg/kg) di pyrantel aggiunto giornalmente all'alimento, a scopo profilattico, pratica assolutamente sbagliata ma molto utilizzata, soprattutto negli allevamenti di grandi dimensioni (Tarigo-Martinie *et al.*, 2001).

Meno chiara è la situazione rispetto al gruppo dei lattoni macrociclici. Uno studio recentemente condotto in Brasile ha confermato per la prima volta l'esistenza di fenomeni di resistenza verso tale classe di farmaci e gli Autori del lavoro hanno ipotizzato anche un ruolo del clima tropicale come fattore predisponente allo sviluppo della resistenza stessa (Moleno *et al.*, 2008). Contemporaneamente, altri studi svolti in diversi Paesi (von Samson- Himmelstjerna *et al.*, 2007; Lyons *et al.*, 2008; Edward e Hoffman, 2008; Rossano *et al.*, 2010) hanno evidenziato un periodo di ricomparsa delle uova di strongili nelle feci (ERP) minore rispetto alle 8-10 settimane riportate precedentemente in letteratura (Boersema *et al.*, 1996; Borgsteede *et al.*, 2003; Lind *et al.*, 2007).

Tali risultati sono stati interpretati come un indice di inizio di comparsa di resistenza nei confronti dell'ivermectina. In studi successivi Lyons *et al.* (2009) hanno chiaramente dimostrato come questo fenomeno sia legato alla sopravvivenza di stadi immaturi del parassita e, apparentemente, una loro maturazione più rapida. Altri studi hanno messo in luce un possibile inizio di resistenza anche nei confronti della moxidectina (Trawford *et al.*, 2005; Moleno *et al.*, 2008). Lyons *et al.*, nel 2010, hanno riscontrato una riduzione del tempo di ricomparsa di uova nelle feci anche per questo farmaco, sebbene non marcata come per l'ivermectina; ma la considerazione più interessante che emerge da questo lavoro è che tali dati sono stati raccolti in aziende che, apparentemente, non avevano mai fatto uso di moxidectina, ma solo di ivermectina. Questo indicherebbe che l'instaurarsi di una buona resistenza all'ivermectina possa comunque penalizzare, anche se in modo minore, l'efficienza della moxidectina. Pare che la resistenza ai lattoni macrociclici sia in gran parte dovuta ad una sovraespressione della glicoproteina-P che, come spiegato nel paragrafo precedente, è coinvolta nell'efflusso dalle cellule del parassita di molti xenobiotici. Questo spiegherebbe perchè nei confronti della moxidectina, che possiede affinità minore per tale pompa di membrana rispetto all'ivermectina, vi siano fenomeni di resistenza meno marcati, nonostante le due appartengano alla medesima classe di farmaci (Prichard *et al.*, 2009). Inoltre la moxidectina, non riuscendo ad uccidere gli stadi più precoci delle larve di piccoli strongili intestinali incistate, esercita una pressione selettiva minore verso ceppi resistenti, mantenendo una proporzione maggiore di popolazione parassitaria che non entra in contatto con il farmaco (*refugia*) (Reinemeyer *et al.*, 2003).

In Italia, studi recenti su tale fenomeno sono stati svolti da Pozzato, nel 2009, evidenziando la totale efficacia della moxidectina nel controllare la parassitosi. In questa esperienza non sono stati rilevati fenomeni di resistenza neanche nei confronti dell'ivermectina, a differenza di quanto emerso da altri studi condotti in sud Italia ed in Inghilterra (Traversa *et al.*, 2009; Campbell *et al.*, 2007). Le prove svolte nei confronti del fenbendazolo, invece, hanno permesso di individuare fenomeni di resistenza in 5 aziende su 6. Per quanto riguarda il Pyrantel 4 delle 10 aziende testate, 3 delle quali già resistenti al fenbendazolo, hanno evidenziato chemioresistenza. Questo testimonia l'avvenuta selezione di popolazioni di Cyathostomini resistenti a benzimidazolici e tetraidropirimidinici nelle aziende del nord-est dell'Italia, in linea

con quanto accertato nel centro-sud, in diversi Paesi europei (Danimarca, Germania, Inghilterra, Rep. Slovacca, Svizzera e Svezia) e negli U.S.A(Traversa *et al.*, 2009).

### 3 SCOPO DELLA RICERCA

La finalità della presente ricerca è stata quella di approfondire le conoscenze relative all'efficacia di moxidectina e fenbendazolo nel controllo delle cyathostomiosi degli equini. Tali molecole sono ampiamente utilizzate a questo scopo già da molti anni ma, mentre si conosce piuttosto approfonditamente la loro efficacia nei confronti dei parassiti adulti, poco è stato pubblicato sulla loro azione contro le larve dei piccoli strongili intestinali.

Come già esposto nei paragrafi 2.8.2 e 2.8.3, entrambi i farmaci sono attivi sugli strongili adulti ma, nei confronti del fenbendazolo, si riscontano fenomeni crescenti di resistenza, evidenziabili principalmente con una diminuzione del valore della FECR (Fecal Egg Count Reduction) e un aumento della dose letale 50 (DL<sub>50</sub>) calcolata mediante Egg Hatch Test (EHT – test di schiusa delle uova (Whitlock *et al.*, 1980; Kelly *et al.*, 1981; Bauer *et al.*, 1986; Ullrich *et al.*, 1988; Drudge, Lyon *et al.*, 1990; Coles *et al.*, 1992; Fisher *et al.*, 1992; Kwa *et al.*, 1993; Nare *et al.*, 1994; Pape *et al.*, 2003; Drogemuller *et al.*, 2004; Pozzato, 2009)). Le evidenze di fenomeni di resistenza alla moxidectina sono invece più sporadiche ed incerte (Trawford *et al.*, 2005; Moleno *et al.*, 2008; Lyons *et al.*, 2010).

La bibliografia che tratta l'azione di queste molecole sugli stadi larvali è meno ampia, anche a fronte di una maggiore difficoltà tecnica nel raccogliere i campioni, che implica il sacrificio dell'animale. Sembra che il fenbendazolo sia attivo su tutti gli stadi larvali del parassita, anche sulle L3 più precoci, ma somministrando la singola dose indicata per 5 giorni consecutivi (Di Pietro *et al.*, 1997). La moxidectina, invece, non sarebbe efficace che sulle larve di IV e V stadio (L4, L5) (Xaio *et al.*, 1994; Eysker *et al.*, 1997; Reinemeyer, 2003), agendo così da refugia antielmintico per quelle di III stadio (Reinemeyer *et al.*, 2003).

Questo studio mira proprio ad evidenziare, in cavalli naturalmente infestati, l'efficacia sugli stadi liberi nel lume intestinale (L4, L5/adulti) (tramite accertamenti copromicroscopici quantitativi) e sulle larve di cyathostomini incistate nella mucosa (mediante metodica di transilluminazione) di moxidectina somministrata in singola dose e di fenbendazolo somministrato con due diverse modalità (dose singola e dose singola ripetuta per 5 giorni consecutivi).



## **4 MATERIALI E METODI**

### **4.1 Scelta e descrizione dell'allevamento**

La parte sperimentale di questo studio è stata svolta in una azienda situata in località Adria, nella provincia di Rovigo.

Si tratta di un allevamento di cavalli da carne a ciclo aperto, che importa animali sia da altre regioni italiane che da Paesi esteri (Francia, Austria e Romania), e si occupa della fase di ingrasso.

Le razze presenti sono: TPR italiano, Comtois e Norica.

Gli animali vengono acquistati all'età di 8-10 mesi e venduti a circa 16-18 mesi; tuttavia, viste le grandi oscillazioni a cui è sottoposto il mercato della carne equina durante l'anno e l'assenza di un'organizzazione di filiera, non esiste un'età standard a cui macellare, come accade per polli o bovini. Di conseguenza, succede spesso che animali della medesima età, introdotti assieme in allevamento, vi rimangano per tempi diversi.

La struttura di partenza dell'azienda è quella di una stalla di bovini da carne, riadattata per accogliere cavalli: sono stati creati una serie di recinti, uno a fianco all'altro, su due file parallele che corrono ai lati di un ampio corridoio centrale (Fig. 14a). Ogni recinto, che contiene da 6 a 8 animali a stabulazione libera, è provvisto di abbeveratoio automatico a tazza e lettiera permanente di paglia che viene rimboccata ogni 10 giorni e sostituita ogni mese (Fig. 14b). L'alimento viene invece distribuito all'esterno del recinto stesso, lungo il lato che dà sul corridoio centrale, ed è di tipo unifeed, contenente: fieno, nucleo per bovini da carne, crusca, farina di mais ed insilato di mais.

Il corridoio laterale di sinistra è dotato di un sistema di cattura, che riesce a contenere dai 3 ai 4 cavalli per volta e che viene utilizzato per effettuare le visite cliniche, i trattamenti farmacologici e la lettura dei transponder sul singolo capo.



**a.**



**b.**

**Fig. 14 a.** Visione della stalla nel suo complesso; **b.** Visione dei recinti.

In azienda vengono effettuati trattamenti antielmintici preventivi di routine con Pyrantel pamoato (Strike®) come polvere da aggiungere all'alimento dopo 7 giorni dall'ingresso degli animali, senza attuare accertamenti copromicroscopici. Questo farmaco, come riportato nel capitolo 2.8.2, è attivo sulla maggior parte degli strongili gastrointestinali degli equini, comprese larve di IV stadio, sugli ossiuri e su primi stadi larvali e forme mature di *Parascaris equorum*; tuttavia, la somministrazione con il cibo non garantisce un'assunzione della dose di farmaco adeguata a tutti i cavalli e, in modo particolare, a quelli più debilitati che risulteranno svantaggiati.

L'azienda è stata scelta per i seguenti motivi: avendo la necessità di effettuare rilievi *post mortem*, i trattamenti andavano eseguiti su animali che fossero destinati alla macellazione e questo allevamento presentava un numero di capi tale da consentire l'organizzazione di gruppi sperimentali. Inoltre l'allevatore si è dimostrato interessato e collaborativo nei confronti della sperimentazione.

Come prima cosa è stata accertata l'effettiva presenza di strongili gastrointestinali nell'allevamento. Per fare ciò sono state raccolte le feci di 12 animali (circa il 10% del numero totale di soggetti presenti in azienda al momento del campionamento).

I cavalli qui allevati non sono abituati ad essere manipolati dall'uomo e questo ha reso impossibile prelevare i campioni fecali direttamente dal retto; pertanto si è optato per raccogliere le feci appena deposte sul terreno.

In data 27 novembre 2009 sono stati eseguiti:

- campionamenti da 12 animali per rilevare la positività per piccoli strongili gastrointestinali;
- esami copromicroscopici quantitativi con tecnica di McMaster (Sloss *et al*, 1994) su ogni campione (vedi paragrafi 2.7.2 e 4.4);
- pool di feci con i campioni risultati positivi all'analisi coprologica, spediti alla Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università degli Studi di Teramo, presso il Dipartimento di Scienze Biomediche Compare, per l'esecuzione della Reverse Line Blot (RBL) hybridization. Questa metodica biomolecolare innovativa è in grado di rilevare la presenza dei piccoli strongili intestinali e di identificarne le specie (almeno le 13 più diffuse a livello mondiale), indipendentemente dal loro stadio di sviluppo (Traversa *et al*, 2007).

Mediante questi accertamenti è stato possibile evidenziare 10 su 12 (83,3%) campioni positivi per piccoli strongili intestinali, con valori u.p.g. oscillati da 0 a 950 (media di 241,7 u.p.g.). Le analisi biomolecolari condotte mediante RLB hanno consentito di accertare la presenza di infestazioni sostenute da cyathostomini. In base a tali risultati l'azienda è quindi risultata idonea alla sperimentazione.

## **4.2 Scelta degli animali**

Si è deciso di iniziare le prove nel mese di febbraio, periodo in cui è alta la probabilità di trovare larve incistate nella mucosa del grosso intestino (Slocombe, 1985; Herd, 1986).

Si sono scelti cavalli di recente introduzione in allevamento, provenienti dalla Francia e dall'Italia, di età simile (circa 9 mesi), non trattati con Strike®.

E' stato identificato, pertanto, un numero di animali idoneo su cui compiere uno screening preliminare che permettesse di suddividerli nei diversi gruppi di trattamento (vedi paragrafo 4.3).

In data 3 febbraio 2010 sono stati raccolti 27 campioni fecali da cavalli di origine francese, allocati in 6 recinti, e 23 campioni da cavalli italiani, distribuiti in 4 recinti. Per ogni recinto si è proceduto alla raccolta di campioni fecali individuali appena emessi sul terreno (per almeno il 50% degli animali ospitati), prestando particolare attenzione a non campionare due o più volte gli stessi soggetti. Tali campioni sono stati analizzati sempre utilizzando la metodica copromicroscopica quantitativa di McMaster (Sloss *et al.*, 1994), al fine di ottenere un valore medio di u.p.g. per ogni recinto e poter scegliere quelli da utilizzare come gruppi sperimentali.

### **4.3 Protocollo di trattamento**

A seguito delle indagini di screening sopra descritte sono stati creati 3 gruppi di trattamento e 1 di controllo, sia per i cavalli di provenienza italiana che francese. Il peso dei soggetti, necessario per il calcolo della dose di farmaco da somministrare, è stato stimato mediante l'uso di un'apposita cintura.

Successivamente si è proceduto come segue:

#### **15 febbraio 2010 (giorno 0):**

- trattamento dei diversi gruppi sperimentali (secondo dosaggio consigliato):
  - 1 dose di moxidectina (MOX) ;
  - 1 dose difenbendazolo (x1FBZ) ;
  - 5 dosi, somministrate in 5 giorni consecutivi, di fenbendazolo (x5FBZ);
  - Nessun trattamento antielmintico (NT-gruppi di controllo non trattati).
- lettura e registrazione del transponder di ogni singolo cavallo trattato;
- raccolta, da ogni recinto, di campioni fecali da destinare alla ricerca di uova di strongili intestinali tramite esame copromicroscopico quantitativo di McMaster. Si è cercato di prelevare un campione per animale e, dove non è stato possibile, da almeno metà dei soggetti del gruppo;
- costituzione di pool ottenuti mescolando i vari campioni di animali provenienti dallo stesso recinto, successivamente inviati al dipartimento di Scienze Biomediche Comparete dell'Università degli Studi di Teramo per l'esecuzione della RLB hybridization (Traversa *et al.*, 2007).

I farmaci utilizzati sono stati:

- Fenbendazolo: Panacur<sup>®</sup> Cavalli pasta, prodotto dalla Casa Farmaceutica Intervet. Si tratta di una pasta da somministrare per via orale, contenente 187,5 mg di fenbendazolo per grammo. La posologia consigliata è di 24 g di pasta (1 siringa) ogni 600 kg di peso vivo.
- Moxidectina: Equest<sup>®</sup>, gel orale, prodotto da Fort Dodge Animal Health. Dose consigliata di 400 µg/kg p.v. di principio attivo corrispondente a 12,2 g di gel (1 siringa) ogni 575 kg.

## **2 marzo 2010 (giorno +14):**

- raccolta di campioni fecali per l'esecuzione di un secondo esame copromicroscopico quantitativo con tecnica di McMaster allo scopo di calcolare la diminuzione di escrezione di uova nelle feci (FECRT%, vedi paragrafo 4.8.1), parametro correlato all'efficacia del trattamento.
- costituzione di pool, creati mescolando i campioni di animali appartenenti allo stesso gruppo sperimentale, nuovamente destinati all'analisi con la metodica RLB hybridization (Traversa *et al.*, 2007) al fine di identificare le specie di parassiti su cui il trattamento non ha avuto effetto.

## **4.4 Analisi di laboratorio**

I campioni di feci raccolti sono stati tutti analizzati utilizzando la tecnica di McMaster. Come descritto nel paragrafo 2.7.2, essa rientra nella categoria degli esami copromicroscopici quantitativi, volti ad ottenere un valore di uova per grammo di feci (u.p.g.). Tali valori (u.p.g. pre e post-trattamento) hanno consentito di calcolare la riduzione, in termini percentuali, della escrezione fecale di uova (FECR: Fecal Egg Count Reduction), indice dell'efficacia dell'intervento e della presenza di resistenza al farmaco (paragrafo 2.8.3).

La tecnica di McMaster è stata effettuata come segue:

- da ogni campione sono stati pesati 2 g di feci, avendo l'accortezza di omogenare prima l'intera massa fecale e prelevare in più punti, fino al raggiungimento della quantità desiderata;
- i 2 g di feci sono stati stemperati in un mortaio, con una soluzione ad alto peso specifico di zinco solfato (500ml di acqua distillata e 500g di solfato di zinco, con peso specifico di 1350);
- ai 2 g di feci è stata aggiunta soluzione, in una provetta Falcon, fino a ottenere un volume di 30 ml;
- dopo avere mescolato delicatamente il contenuto della provetta, utilizzando una garza come filtro per allontanare il particolato, si è aspirata un po' di soluzione con una pipetta;
- con tale soluzione si è riempita la camera di McMaster, senza creare bolle;

- osservando al microscopio ottico (obiettivo 10x) le 2 griglie presenti sulla camera, si sono contate le uova di strongili. Quando non si reperivano uova dentro i reticoli, si sono ricercate fuori di essi: in tal caso il campione non viene considerato negativo ma con una positività sotto il valore soglia di sensibilità della metodica che, con 2 g di feci, risulta di 50 u.p.g. (vedi paragrafo 2.7.2). Nel caso non venissero reperite delle uova di strongili intestinali, il campione veniva considerato negativo.

Come già spiegato nella parte generale, l'esame copromicroscopico di McMaster non consente di differenziare le varie specie di strongili gastrointestinali in quanto, pur con lievi differenze, le loro uova non sono morfologicamente distinguibili. Una buona diagnosi qualitativa è invece possibile sulle larve infestanti L3 (vedi tab. 2, paragrafo. 2.2.2). Per ottenere le L3 è stata eseguita una coprocoltura, metodica diagnostica già descritta nel paragrafo 2.7.1.

In questo studio è stato creato un pool mescolando tutti i campioni di feci ottenuti dallo stesso gruppo sperimentale e risultati positivi all'esame copromicroscopico effettuato al 14° giorno post-trattamento (NT italiani, NT francesi e x1FBZ francesi). Tali feci sono state mescolate in un piatto con acqua ed argilla espansa e poste in incubazione alla temperatura di + 26-28°C per 10-12 giorni (Fig. 15). In questo modo si sono create le condizioni più adatte alla schiusa e allo sviluppo larvale, avendo l'accortezza di aggiungere quotidianamente dell'acqua e di mescolare la massa per garantire una migliore aerazione.



**Fig. 15** Preparazione della coprocoltura.

Una volta trascorso il tempo necessario allo sviluppo delle larve infestanti L3, queste ultime venivano isolate dal terreno di coltura utilizzando la metodica di Baerman (Fig. 16), che sfrutta il naturale igrotropismo dei parassiti. L'apparecchio è costituito da un imbuto dotato di rubinetto all'uscita. Tale rubinetto viene chiuso e l'imbuto riempito d'acqua. A questo punto, interponendo un filtro, si pone tutto il materiale usato per la coprocoltura su un supporto di rete metallica da incastrare nell'imbuto stesso. Le larve infestanti tendono naturalmente ad abbandonare la massa fecale e a portarsi verso l'acqua pulita, ossia verso il fondo dell'apparecchio. Trascorse almeno 10-12 ore è sufficiente aprire il rubinetto e raccogliere il sedimento contenente le larve. La loro effettiva presenza è stata poi accertata analizzando i campioni allo stereomicroscopio e procedendo, per alcune larve, ad una loro identificazione su base morfologica al microscopio ottico (obiettivi 10x e 40x). In seguito le larve rinvenute sono state congelate a  $-20^{\circ}\text{C}$  e successivamente inviate presso il Dipartimento di Scienze Biomediche Comparative dell'Università degli Studi di Teramo per il riconoscimento di specie basato su RLB hybridization.





**Fig. 16** Apparecchio di Baerman.

#### **4.5 Prelievi al macello**

Nel corso della sperimentazione sono state effettuate analisi del contenuto intestinale, finalizzate alla ricerca e conteggio di stadi parassitari liberi nel lume (L4, L5/adulti), e di campioni di mucosa di cieco, colon ventrale e colon dorsale per la ricerca e la quantificazione degli stadi larvali incistati (L3, L4) di cyathostomini.

Il protocollo, pertanto, prevedeva di seguire la macellazione di almeno 4 cavalli per gruppo sperimentale, al fine di recuperare i tratti di intestino appena citati.

Per fare ciò ci si è avvalsi dell'aiuto dell'allevatore che, tramite la lettura del transponder, eseguita prima di inviare gli animali al macello, ci ha permesso di tracciarne la destinazione finale. L'allevamento in prova conferisce cavalli a diversi macelli nelle seguenti località: Castagnaro (VR), Sant'Urbano (PD), Arre (PD), Agna (PD), Rosolina (RO) e Bagnolo in Piano (RE).

Gli intestini dei cavalli venivano raccolti dopo l'eviscerazione e trasportati in appositi bidoni, per essere posti in frigo a +4°C e analizzati nel minor tempo possibile.

## **4.6 Preparazione del campione per la ricerca dei parassiti**

Nel giro di pochi giorni, per ogni campione, si è seguito tale protocollo:

- cieco, colon ventrale e colon dorsale sono stati divisi in 3 vasche separate, avendo l'accortezza di legarne le estremità per limitare al minimo la perdita del loro contenuto (17 Fig. a);
- ogni tratto è stato pesato con tutto il suo contenuto;
- si è proceduto svuotando il materiale intestinale nella vasca e lavando accuratamente con acqua il tessuto (17 Fig. b);
- una volta pesato il tratto intestinale lavato, è stato ricavato il peso del suo contenuto e ne sono stati raccolti 400 g; su questa aliquota sono stati ricercati, con opportuni lavaggi in acqua e l'ausilio di un setaccio e di una pinza, i parassiti luminali (L4, L5/adulti) di cyathostomini (17 Fig. c). Essi, se rinvenuti, venivano congelati a  $-80^{\circ}\text{C}$  e inviati presso l'Istituto di Parassitologia e Medicina Veterinaria Tropicale dell'Università di Berlino per accertamenti biomolecolari finalizzati al riconoscimento di specie;
- la parete intestinale è stata ben distesa su un piano eliminando il più possibile le pieghe e, mediante l'ausilio di un bisturi, si è proceduto a ritagliare 6 dischi per tratto, ciascuno avente area di  $32\text{ cm}^2$  (17 Fig. d);
- tutti i dischi di mucosa raccolti sono stati conservati in frigo alla temperatura di  $+4^{\circ}\text{C}$ , suddivisi nei vari tratti da cui provenivano (cieco, colon ventrale e colon dorsale) e destinati, entro 24, ore alla transilluminazione (paragrafo 4.7);
- inoltre per ogni tratto è stata prelevata una quantità di mucosa pari al 2,5% del peso, asportandola da più punti con una forbice (17 Fig. e-f). Tale campione è stato congelato ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) in attesa di essere analizzato mediante digestione enzimatica, altra metodica finalizzata all'isolamento e al conteggio delle larve incistate.



a.



b.



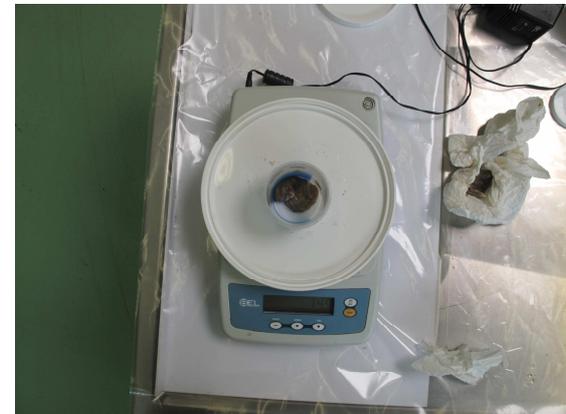
c.



d.



e.



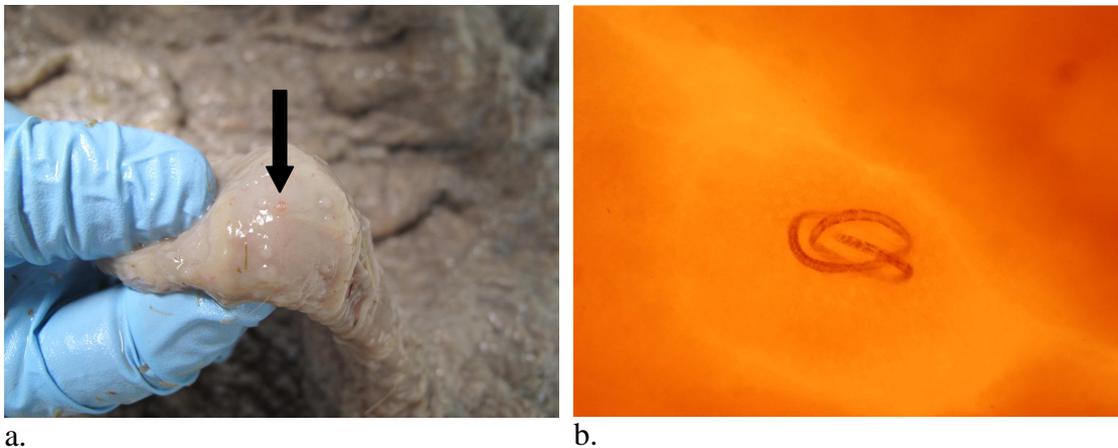
f.

**Fig. 17** a. Divisione di cieco, colon ventrale e colon dorsale; b. Mucosa lavata; c. Ricerca dei parassiti adulti; d. Prelievo di mucosa per digestione enzimatica; e. Pesata del campione di mucosa; f. Prelievo di mucosa per la transilluminazione.

#### **4.7 Ricerca delle larve mediante transilluminazione**

La tecnica della transilluminazione consiste nel porre il campione di tessuto sopra una fonte luminosa sufficientemente forte da attraversarne i tessuti, mettendo così in risalto la presenza di noduli nella mucosa e sottomucosa contenenti le larve dei piccoli strongili incistate (già visibili ad occhio nudo).

Per fare ciò è stato utilizzato uno stereomicroscopio che, oltre ad essere dotato di una fonte luminosa adatta, permette anche di osservare il campione ingrandito (10x-15x), rendendo più facile e preciso il riconoscimento delle larve (Fig. 18).



**Fig. 18** a. Larva vista ad occhio nudo (freccia); b. Larva vista allo stereomicroscopio.

Ciascuno dei sei dischi, raccolti per ogni tratto intestinale scelto, è stato esaminato su tutta la superficie utilizzando tale tecnica.

Una volta osservati allo stereo microscopio, i dischi venivano suddivisi inizialmente, per ogni tratto, in positivi e negativi per presenza di larve incistate. Poi, ciascun disco è stato diviso in due: una metà destinata all'istologia (conservata in formalina al 10%) e l'altra alla ricerca dei mediatori dell'infiammazione (congelata a -20°C). Tali campioni sono stati conservati in attesa di essere analizzati presso il Dipartimento di Scienze Biomediche Comparate dell'Università degli Studi di Teramo, al fine di confrontare le risposte infiammatorie e le lesioni istologiche associate ai diversi gruppi sperimentali (MOX, x1FBZ e x5FBZ). Come già riportato, infatti, sembra che il fenbendazolo sia in grado di causare una risposta infiammatoria a livello di parete intestinale tale da mimare una cyathostomiosi larvale (Steinbach *et al.*, 2006).

## **4.8 Analisi dei dati**

### **4.8.1 Prove in vivo (FECRT – Fecal Egg Count Reduction Test)**

Per ogni gruppo sperimentale (NT-controlli non trattati, MOX, x1FBZ e x5FBZ) sono stati calcolati i valori medi u.p.g. sui campioni di feci raccolti nei giorni di screening (03/02/2010), trattamento (giorno 0; 15/02/2010) e post-trattamento (giorno +14; 02/03/2010).

La percentuale di riduzione della escrezione fecale di uova (FECR%) è stata calcolata mediante la seguente formula, considerando ciascun gruppo sperimentale e la diversa provenienza dei soggetti (Francia e Italia):

$$FECR (\%) = \frac{u.p.g. \text{ pre}T - u.p.g. \text{ post}T}{u.p.g. \text{ pre}T} \times 100$$

dove *u.p.g. preT* e *u.p.g. postT* rappresentano rispettivamente i valori medi (media aritmetica) di uova per grammo riscontrati prima (giorno 0) e dopo (giorno +14) il trattamento antielmintico.

Il risultato è stato interpretato come segue (Kaplan, 2004):

- FECR > 90%: antielmintico efficace;
- FECR < 80%: antielmintico non efficace;
- 80% ≤ FECR ≤ 90%: antielmintico di dubbia efficacia (resistenza sospetta).

I valori di FECR (%) sono stati calcolati anche per i gruppi di controllo (NT), al fine di provare il mantenimento della infestazione da cyathostomini nel corso delle prove in vivo.

Nel caso in cui in un gruppo sperimentale il conteggio fecale di uova (FEC) incrementasse dal giorno 0 (trattamento) al giorno +14, la percentuale di FECR viene considerata pari a zero.

#### 4.8.2 Rilievi post mortem

Per ciascuno dei soggetti sui quali risultava possibile effettuare i rilievi post-macellazione, si è proceduto alla registrazione (foglio di lavoro Excel 2010.Ink) dei seguenti dati: data e sede di macellazione, intervallo (espresso in giorni) tra giorno 0 (trattamento) e macellazione, numero totale di larve di cyathostomini incistate nella mucosa (stadi L3 e “grandi” L4, queste ultime di aspetto rossastro e di dimensioni superiori a 4 mm) e numero di esemplari di cyathostomini liberi nel lume intestinale, rappresentati da L4 e L5, emerse dalla mucosa, e adulti. Il conteggio degli esemplari di cyathostomini, sia incistati che liberi nel lume, è stato effettuato prendendo in considerazione anche le diverse sedi anatomiche del grosso intestino (cieco, colon dorsale e colon ventrale).

Per ciascun gruppo di trattamento (x5FBZ, x1FBZ, MOX) è stata valutata, relativamente ai controlli non trattati (NT), la riduzione in termini percentuali (R%) di elementi parassitari, riscontrata sia per gli stadi larvali incistati che per quelli liberi nel lume. Allo scopo è stata utilizzata la seguente formula:

$$R (\%) = \frac{MA \text{ controlli} - MA \text{ trattati}}{MA \text{ controlli}} \times 100$$

dove *MA*= media aritmetica. Nel caso in cui la *MA* dei trattati risultasse superiore a quella dei controlli, l'efficacia del trattamento (R%) verso gli stadi incistati e/o liberi nel lume veniva calcolata pari a zero.

Considerata l'elevata variabilità di tempo (70-245 giorni) intercorso tra giorno 0 (trattamento) e macellazione per soggetti appartenenti a diversi gruppi sperimentali, motivata da imprescindibili esigenze d'allevamento e da fluttuazioni della domanda di mercato della carne equina, i valori di R% sono stati calcolati indipendentemente dalla provenienza (Italia o Francia) degli animali e considerando tre diversi intervalli di tempo tra giorno 0 (trattamento) e macellazione:

- a) 70-245 giorni (tutti i soggetti: n=35);
- b) 70-146 giorni (n=17);
- c) 170-245 giorni (n=18).

Tra il 146° e il 170° giorno non vi sono stati animali sacrificati.

Relativamente agli stessi intervalli di tempo è stata effettuata l'analisi statistica per confrontare le quantità (valori totali) sia di stadi larvali incistati che di cyathostomini liberi nel lume, riscontrati post-trattamento nei diversi gruppi sperimentali. Allo scopo è stato utilizzato il test non parametrico di Mann-Whitney a campioni indipendenti. Il software utilizzato è stato SPSS per Windows, versione 15.0 e la soglia di significatività prescelta di  $p < 0,05$ .



## 5. RISULTATI

### 5.1 Prove in vivo (FECRTs)

All'inizio del periodo di prova risultavano disponibili 76 cavalli (39 di origine francese e 37 di origine italiana). Gli animali erano distribuiti in 10 diversi box, di cui 9 ospitavano ciascuno da 6 a 8 soggetti, mentre nel rimanente box (di superficie doppia rispetto ai precedenti) erano presenti 14 animali. Le indagini copromicroscopiche di screening condotte il giorno 03/02/2011 hanno consentito di individuare un box di 6 soggetti francesi negativi per uova di strongili intestinali e che, pertanto, sono stati esclusi dallo studio. Nella tabella 5 vengono riportati i risultati degli accertamenti copromicroscopici di screening e delle prove in vivo (FECRT) riferiti alla totalità dei soggetti (n=70), indipendentemente dalla loro provenienza. In generale, le prove in vivo hanno consentito di valutare come efficaci i diversi trattamenti effettuati, con valori di FECR risultati del 100% per MOX e x5FBZ, e del 98,6% per i soggetti trattati con x1FBZ. Solo per il gruppo di soggetti francesi (tabella 6) trattato con FBZ in dose singola si è evidenziata una situazione di sospetta resistenza (FECR=83,3%). Il calcolo dei valori di FECRT effettuato anche sui gruppi di controllo (non trattati) ha consentito di provare sia nei soggetti francesi (tabella 6) che in quelli italiani (tabella 7) la persistenza della infestazione nel corso delle prove in vivo, sebbene in quelli italiani sia stata evidenziata una riduzione del 48,1% al giorno +14.

Gruppi	n.a.	3/2/2010 (screening)		15/2/2010 (giorno 0)		2/3/2010 (giorno +14)		FECR (%)
		n.c.	u.p.g.	n.c.	u.p.g.	n.c.	u.p.g.	
Controlli	22	13	96,2	20	85	16	65,6	22,8
MOX	21	12	116,7	11	90,9	15	0	100
x1FBZ	14	10	165	6	291,7	12	4,2	98,6
X5FBZ	13	10	660	7	207,1	10	0	100

(n.a.=numero di animali presenti in ogni gruppo sperimentale; n.c.=numero di campioni analizzati)

**Tabella 5** Valori medi u.p.g. (uova per grammo) e risultati delle prove in vivo (FECRT) riscontrati nei diversi gruppi sperimentali considerando la totalità dei soggetti (n=70).

Gruppi Francesi	n.a.	3/2/2010 (screening)		15/2/2010 (giorno 0)		2/3/2010 (giorno +14)		FECR (%)
		n.c.	u.p.g.	n.c.	u.p.g.	n.c.	u.p.g.	
Controlli	14	9	55,6	12	66,7	10	70	0
MOX	7	4	100	4	100	4	0	100
x1FBZ	6	4	75	3	50	6	8,3	83,3
X5FBZ	6	5	180	3	116,7	5	0	100

(n.a.=numero di animali presenti in ogni gruppo sperimentale; n.c.=numero di campioni analizzati)

**Tabella 6** Cavalli francesi: valori medi u.p.g. (uova per grammo) e risultato delle prove in vivo (FECRT) riscontrati nei diversi gruppi sperimentali.

Gruppi Italiani	n.a.	3/2/2010 (screening)		15/2/2010 (giorno 0)		2/3/2010 (giorno +14)		FECR (%)
		n.c.	u.p.g.	n.c.	u.p.g.	n.c.	u.p.g.	
Controlli	8	4	187,5	8	112,5	6	58,3	48,1
MOX	14	8	125	7	85,7	11	0	100
x1FBZ	8	6	225	3	533,3	6	0	100
X5FBZ	7	5	1140	4	275	5	0	100

(n.a.=numero di animali presenti in ogni gruppo sperimentale; n.c.=numero di campioni analizzati)

**Tabella 7** Cavalli italiani: valori medi u.p.g. (uova per grammo) e risultato delle prove in vivo (FECRT) riscontrati nei diversi gruppi sperimentali.

In nessuno dei soggetti in prova sono state osservate reazioni avverse ai diversi trattamenti antelmintici effettuati, così come non si sono verificati problemi sanitari di altra natura durante l'intero periodo di studio.

Le indagini biomolecolari condotte mediante RLB hybridization sugli 8 pool di feci (4 dai soggetti francesi e 4 da quelli italiani) prelevate al giorno 0 dai diversi gruppi sperimentali hanno permesso di attribuire l'infestazione a popolazioni di cyathostomini (sono in svolgimento le identificazione di specie sui medesimi campioni). Gli stessi accertamenti molecolari, condotti sulle larve isolate mediante tecnica di Baerman dai 3 pool di feci ottenuti dai campioni positivi al giorno +14 (1 pool dai controlli francesi, 1 pool dai controlli italiani e 1 pool dai soggetti francesi trattati con FBZ in dose singola) hanno confermato l'infestazione da piccoli strongili, convalidando anche i rilievi biometrici e morfologici effettuati su alcuni esemplari di larve L3 ottenute dalle stesse coproculture (fig. 19).



**Fig. 19** Cyathostomini: larva di terzo stadio isolata mediante tecnica di Baerman (obbiettivo 4x).

## 5.2 Rilievi post mortem

Nel corso dello studio è stato possibile effettuare i rilievi *post-mortem* su un totale di 35 soggetti macellati a partire da 70 a 245 giorni post-trattamento.

N.	Gruppo sperimentale	Provenienza (I=Italia; F=Francia)	Giorni dal trattamento (15-2-2010)	Cyathostomini (n.)	
				Stadi luminali	Stadi incistati
1	Controlli non trattati (NT)	I	70	0	85
2		I	84	28	428
3		F	98	101	0
4		I	146	0	196
5		I	146	0	179
6		I	146	0	568
7		F	170	97	584
8		F	170	68	269
9		F	174	37	0
10		I	181	16	0
11		F	217	0	192
12	MOX	I	104	0	86
13		I	139	0	615
14		I	139	0	301
15		I	139	0	645
16		F	174	0	328
17		F	174	181	1642
18		F	174	0	0
19		F	174	0	0
20		I	203	38	155
21	x1FBZ	F	112	21	427
22		F	174	18	0
23		I	181	338	267
24		I	185	71	272
25		F	189	0	0
26		I	203	36	173
27		I	245	0	465
28		I	245	0	124
29	x5FBZ	I	73	47	302
30		F	77	0	0
31		I	80	0	51
32		I	90	763	27088
33		I	125	46	415
34		F	140	60	500
35		F	185	490	1859

**Tabella 8** Dettaglio dei 35 soggetti sottoposti ai rilievi *post-mortem*.

Nella tabella 8 vengono elencati tutti i soggetti sacrificati, con i dettagli relativi alla loro provenienza, al gruppo sperimentale di appartenenza, all'intervallo trattamento-macellazione e al conteggio della popolazione di cyathostomini ritrovati, sia come larve incistate nella mucosa (stadi L3 e “grandi” L4) che come esemplari liberi nel lume del grosso intestino (L4 e L5/adulti).

Nel corso delle analisi condotte sui grossi intestini appartenenti ai 35 animali macellati è stata stimata una popolazione totale di 40.670,6 esemplari di cyathostomini, di cui 2.452,3 liberi nel lume (L4, L5/adulti) e 38.218,4 incistati nella mucosa (L3, “grandi” L4).

Nelle tabelle 9 e 10 vengono riportati rispettivamente i valori numerici di stadi luminali e di larve incistate di cyathostomini stimati nei diversi tratti di intestino crasso, appartenenti ai 35 animali oggetto di studio, e ripartiti nei diversi gruppi sperimentali.

Sul totale degli esemplari di cyathostomini presenti nel lume dell'intestino crasso, la maggior parte è risultata localizzata a livello di colon (2213,6 su 2452,3 totali, corrispondenti al 90,3%), mentre solo una piccola proporzione di parassiti (238,8 su 2452,3 totali, pari al 9,7%) è stata rinvenuta nel cieco. A livello di colon, oltre la metà dei cyathostomini liberi nel lume è stata ritrovata nella regione ventrale (1277,3 su 2213,6, pari al 57,7%) (tabella 9). Questa distribuzione, osservata sul totale degli animali, viene mantenuta anche se si separano i dati in base alla provenienza italiana o francese, nei quali la proporzione di parassiti reperiti nel cieco è oscillata dallo 0,0% al 17,0%.

<b>Gruppi sperimentali</b>	<b>Cieco</b>	<b>Colon dorsale</b>	<b>Colon ventrale</b>	<b>Totale</b>
NT	46,8	93,0	205,5	345,3
%	13,5	26,9	59,5	100,0
MOX	0,0	14,3	204,5	218,8
%	0,0	6,5	93,5	100,0
x1FBZ	82,0	42,2	358,5	482,8
%	17,0	8,8	74,3	100,0
x5FBZ	110,0	786,8	508,8	1405,5
%	7,8	56,0	36,2	100,0
<b>Totale</b>	<b>238,8</b>	<b>936,3</b>	<b>1277,3</b>	<b>2452,3</b>
%	<b>9,7</b>	<b>38,2</b>	<b>52,1</b>	<b>100,0</b>

**Tabella 9** Stadi luminali (n. di L4 e L5/adulti) di cyathostomini ripartiti nei diversi tratti di intestino crasso appartenenti ai 35 animali oggetto di studio.

Per quanto riguarda gli stadi incistati, la totalità degli esemplari stimati è risultata pressoché equamente ripartita tra la mucosa del cieco (20625,4 su 38218,4 totali, pari al 54,0%) e quella del colon (17593 su 38218,4 totali, corrispondente al 46,0%). Questo risultato si osserva anche dividendo i dati nei diversi gruppi di trattamento, fatta eccezione per quello trattato con MOX, nel quale è stata evidenziata una concentrazione decisamente maggiore (80,3%) di larve incistate nella mucosa del cieco. A livello di colon, le larve dei cyathostomini sono risultate principalmente incistate nella regione ventrale (13802,8 su 17593, pari al 78,5%), analogamente a quanto evidenziato in ciascun gruppo sperimentale (tabella 10). Queste evidenze concordano con quanto riportato in bibliografia ( Reinemeyer, 1986).

<b>Gruppi sperimentali</b>	<b>Cieco</b>	<b>Colon dorsale</b>	<b>Colon ventrale</b>	<b>Totale</b>
NT	1327,0	185,2	989,0	2501,2
%	53,1	7,4	39,5	100,0
MOX	3030,9	35,7	706,2	3772,8
%	80,3	0,9	18,7	100,0
x1FBZ	875,8	0,0	852,9	1728,7
%	50,7	0,0	49,3	100,0
x5FBZ	15391,7	3569,3	11254,7	30215,7
%	50,9	11,8	37,2	100,0
<b>Totale</b>	<b>20625,4</b>	<b>3790,2</b>	<b>13802,8</b>	<b>38218,4</b>
%	<b>54,0</b>	<b>9,9</b>	<b>36,1</b>	<b>100,0</b>

**Tabella 10** Stadi larvali incistati (n. di L3 e “grosse” L4) di cyathostomini ripartiti nei diversi tratti di intestino crasso appartenenti ai 35 animali oggetto di studio.

Prendendo in considerazione tutti i 35 soggetti macellati nell’intervallo di tempo compreso tra i 70 e i 245 giorni post-trattamento, per nessuno dei diversi gruppi trattati (MOX, x1FBZ, x5FBZ) sono state rinvenute quantità totali di larve incistate e/o di stadi luminali di cyathostomini significativamente diverse a quelle riscontrate nel gruppo di controllo non trattato (NT). Relativamente al gruppo NT, infatti, non sono state evidenziate significative riduzioni in termini percentuali (R%) della popolazione di cyathostomini nei gruppi trattati (vedi formula cap. 4.8.2), che si sono attestate su valori nulli o prossimi allo zero, fatta eccezione del valore R=22,6% (comunque non significativo; p=0,265) calcolato per gli stadi luminali (L4 e L5/adulti) isolati nel gruppo trattato con MOX (tabella 11).

Considerando i confronti tra i diversi gruppi di trattamento (MOX, x1FBZ, x5FBZ), la proporzione di cyathostomini luminali ritrovata nei soggetti trattati con MOX è risultata significativamente inferiore ( $p=0,041$ ) a quella riscontrata negli animali trattati con FBZ per cinque giorni consecutivi. Nessuna differenza statisticamente significativa è stata invece evidenziata nei confronti MOX vs. x1FBZ e x1FBZ vs. x5FBZ, sia per quanto riguarda gli stadi incistati nella mucosa che per quelli liberi nel lume.

Gruppo sperimentale (n. animali)	Stadi luminali			Stadi incistati		
	MA±ds*	R (%)	p	MA±ds	R (%)	p
NT (11)	31±39,5	-	-	227±215,7	-	-
MOX (9)	24±60,1	22,6	0,265	419±517,1	0	0,422
x1FBZ (8)	60±114,6	0	0,830	216±175,7	5,0	0,934
X5FBZ (7)	201±302,2	0	0,243	4317±10.060,6	0	0,237

\*ds=deviazione standard

**Tabella 11** Rilievi *post-mortem* relativi alla totalità dei soggetti ( $n=35$ ) macellati tra 70 e 245 giorni post-trattamento. Media aritmetica (MA) di stadi luminali e larve incistate, efficacia (R%) e valori di significatività p (test Mann-Whitney) riferiti ai controlli non trattati (NT).

Nelle tabelle 12 e 13 vengono riportati i risultati dei rilievi *post-mortem* effettuati rispettivamente negli intervalli di tempo compresi tra 70 e 146 giorni (17 animali) e tra 170 e 245 giorni (18 animali). Relativamente all'intervallo 70-146 giorni è stato escluso dalla elaborazione statistica il gruppo x1FBZ, per il quale sono risultati disponibili i rilievi *post-mortem* relativi ad un unico soggetto. Analogamente, nel considerare i rilievi ottenuti dai soggetti sacrificati nell'intervallo 170-245 giorni è stato escluso il gruppo x5FBZ (un solo soggetto macellato nel periodo in questione). Nell'intervallo 70-146 giorni (tabella 12) nei soggetti trattati con MOX è stata riscontrata la totale efficacia ( $R=100\%$ ) nei confronti della popolazione luminale di cyathostomini, sebbene questo risultato non venga accompagnato da una significatività statistica ( $p=0,224$ ) quando rapportato al gruppo di controllo NT.

In linea con quanto ritrovato analizzando i dati relativi a tutti i 35 animali macellati (intervallo 70-245 giorni), anche in questo primo intervallo di tempo (70-146 giorni) la proporzione di stadi luminali presente nei soggetti del gruppo x5FBZ è risultata superiore, con valori prossimi alla significatività statistica ( $p=0,055$ ), a quella evidenziata per gli animali trattati con MOX.

Comparativamente ai controlli, anche in questo primo intervallo trattamento-macellazione (70-146 giorni) l'efficacia (R%) di MOX e x5FBZ sugli stadi larvali incistati è risultata nulla. Considerando sempre gli stadi larvali incistati e lo stesso intervallo (70-146 giorni), non è stata riscontrata alcuna differenza statisticamente significativa ( $p=0,670$ ) nel confronto MOX vs. x5FBZ.

Gruppo sperimentale (n. animali)	Stadi luminali			Stadi incistati		
	MA±ds*	R (%)	p	MA±ds	R (%)	p
NT (6)	21±40,4	-	-	243±214,6	-	-
MOX (4)	0	100	0,224	412±267,0	0	0,201
x1FBZ (1)	n.c.**	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
X5FBZ (6)	153±300,1	0	0,232	4726±10.956,7	0	0,688

\*ds=deviazione standard

\*\*n.c.=non calcolato

**Tabella 12** Rilievi *post-mortem* relativi ai 17 soggetti macellati tra 70 e 146 giorni post-trattamento. Media aritmetica (MA) di stadi luminali e larve incistate, efficacia (R%) e valori di significatività p (test Mann-Whitney) riferiti ai controlli non trattati (NT)

Nell'intervallo 170-245 giorni (tabella 13), nessuno dei diversi gruppi di trattamento che è stato possibile prendere in considerazione (MOX e x1FBZ) ha evidenziato una significativa riduzione, relativamente ai controlli, della popolazione larvale incistata e/o di stadi di cyathostomini liberi nel lume, (valori R% risultati pari a 0 per entrambi i gruppi di trattamento).

Considerando sia gli stadi larvali incistati che quelli luminali, nello stesso intervallo (170-245 giorni) non è stata riscontrata alcuna differenza statisticamente significativa (rispettivamente:  $p=0,934$  e  $p=0,729$ ) nel confronto MOX vs. x1FBZ.

Gruppo sperimentale (n. animali)	Stadi luminali			Stadi incistati		
	MA±ds*	R (%)	p	MA±ds	R (%)	p
NT (5)	43±39,1	-	-	209±240,8	-	-
MOX (5)	44±78,6	0	0,518	425±693,7	0	0,914
x1FBZ (7)	66±122,6	0	0,729	186±165,9	0	0,934
X5FBZ (1)	n.c.**	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.

\*ds=deviazione standard

\*\*n.c.=non calcolato

**Tabella 13** Rilievi *post-mortem* relativi ai 18 soggetti macellati tra 170 e 245 giorni post-trattamento. Media aritmetica (MA) di stadi luminali e larve incistate, efficacia (R%) e valori di significatività p (test Mann-Whitney) riferiti ai controlli non trattati (NT).

## 6. CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

Le prove in vivo (FECRT- Fecal Egg Count Reduction Test) hanno consentito di accertare la totale efficacia (FECR=100%) di MOX e x5FBZ nei confronti della popolazione adulta di cyathostomini. Nel corso di tali prove è stata dimostrata anche l'efficacia (98,6%) del trattamento con una singola dose di FBZ, sebbene la positività copromicroscopica riscontrata post-trattamento nel gruppo di soggetti di origine francese, nei quali è stata evidenziata una FECR pari all'83,3%, dimostra come l'utilizzo di questa molecola possa non garantire la totale eliminazione della popolazione adulta di cyathostomini. Tale osservazione viene avvalorata dalle numerose segnalazioni di popolazioni di cyathostomini resistenti al FBZ in Italia, in diversi Paesi europei (Danimarca, Germania, Inghilterra, Rep. Slovacca, Svizzera e Svezia) e negli Stati Uniti (Traversa *et al.*, 2009; Pozzato, 2009).

Per la specie equina, relativamente alle infestazioni da cyathostomini non esistono ancora precise indicazioni della W.A.A.V.P. (World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology) sulle modalità con le quali condurre le prove in vivo, in particolare sul numero minimo di animali da utilizzare nei diversi gruppi sperimentali, sulla FEC (Fecal Egg Count) minima pre-trattamento necessaria per arruolare i soggetti, sulla sensibilità minima dei test copromicroscopici da utilizzare per la determinazione dei valori di FEC, così come sui criteri di analisi dei dati per il calcolo della FECR e sui valori (%) di FECR da considerare come *cut off* per dichiarare la resistenza nei confronti di una certa molecola (Kaplan, 2002). Tuttavia, alcuni Autori ritengono che per i benzimidazoli dei valori di FECR inferiori al 90% (calcolati analizzando i dati come effettuato in questo studio) siano già da considerare come indicativi di resistenza (Bauer *et al.*, 1986).

Nel corso delle prove in vivo è stata osservata in alcuni gruppi sperimentali una riduzione dei valori di FEC tra gli accertamenti di screening (3/2/2010) e il giorno 0 (trattamento del 15/2/2010), così come nei soggetti del gruppo di controllo italiano (non trattati), nei quali è stata riscontrata una progressiva riduzione della FEC a partire dagli accertamenti di screening, con una FECR (dal giorno 0 al giorno +14) risultata del 48,1%. Questa "spontanea" riduzione della escrezione fecale di uova potrebbe essere associata non solo ad un effetto di campionamento, ma anche a fenomeni di "self-cure" che possono interessare i giovani soggetti nel corso delle

prime infestazioni da cyathostomini, con conseguente eliminazione di buona parte della popolazione adulta come osservato in altri studi (Eysker *et al.*, 1992, 1997).

Secondo quanto indicato nella seconda edizione delle linee guida della W.A.A.V.P., riguardanti la valutazione dell'efficacia degli antelmintici utilizzati per il controllo dei principali parassiti degli equini, una corretta procedura richiederebbe il sacrificio (e quindi i rilievi *post mortem*) di tutti gli animali appartenenti ai diversi gruppi sperimentali (trattati e controlli) a 2 oppure a 6 settimane post-trattamento, a seconda della necessità di valutare l'efficacia di una molecola rispettivamente nei confronti degli stadi adulti o degli stadi immaturi dei parassiti (un intervallo trattamento-macellazione troppo breve potrebbe non escludere il rilievo di larve uccise col trattamento ma ancora presenti nella mucosa). Inoltre, durante l'intervallo trattamento-macellazione, gli animali in prova non dovrebbero essere esposti a reinfestazioni (Duncan *et al.*, 2002). Purtroppo in questo studio non è stato possibile rispettare tali indicazioni e, in particolare, le tempistiche, in quanto imprescindibili esigenze di allevamento, legate soprattutto ad una sensibile riduzione della richiesta di mercato di carne equina, hanno allungato notevolmente l'intervallo di tempo intercorso tra trattamento e macellazione, con un totale di 35 soggetti distribuiti nei diversi gruppi sperimentali (11 controlli-NT, 9 MOX, 8 x1FBZ e 7 x5FBZ) sacrificati dai 70 ai 245 giorni post-trattamento. Tuttavia, i rilievi *post-mortem* effettuati su questi animali consentono alcune considerazioni riguardanti l'impiego della moxidectina e del fenbendazolo per il controllo delle cyathostominosi in cavalli naturalmente infestati, mantenuti nelle stesse condizioni di allevamento e sottoposti a possibili reinfestazioni da piccoli strongili.

Nei tre gruppi di trattamento (MOX, x1FBZ, x5FBZ), sui rilievi *post mortem* effettuati a 70-245 giorni su tutti i soggetti in prova (n=35) non sono stati evidenziati conteggi di stadi luminali (L4, L5/adulti) e/o di stadi larvali incistati (L3, "grandi" L4) significativamente inferiori a quelli riscontrati nei controlli-NT. Questo risultato potrebbe essere legato al lungo intervallo di tempo (da 70 a 245 giorni) intercorso tra trattamento e i rilievi *post mortem* stessi; infatti, in un arco di tempo così ampio è logico ipotizzare che nei rilievi *post mortem* effettuati sui soggetti trattati possano essere state ritrovate popolazioni di larve incistate sopravvissute al trattamento e/o di stadi luminali eventualmente derivati da esse, così come popolazioni di larve incistate e/o di stadi luminali sviluppatasi a seguito di possibili reinfestazioni, ipotesi,

quest'ultima, compatibile con il periodo di prepatenza che caratterizza i cyathostomini (2-3 mesi). Inoltre, come ipotizzato da Duncan *et al.* (2002), durante un periodo post-trattamento così dilatato non è possibile escludere una naturale eliminazione dei parassiti da parte dei soggetti di controllo, con conseguente sottostima dell'efficacia dei trattamenti antielmintici effettuati. Queste considerazioni potrebbero giustificare la scarsa o nulla efficacia (R%) calcolata per i diversi gruppi di trattamento (nei confronti sia della popolazione luminale che degli stadi larvali incistati) considerando i rilievi *post-mortem* effettuati dai 70 ai 245 giorni (su tutti i 35 soggetti) e dai 170 ai 245 giorni (su 18 animali) post-trattamento.

Sebbene anche per i rilievi *post mortem* eseguiti a 70-146 giorni (su 17 animali) non siano state evidenziate, nei gruppi trattati, riduzioni statisticamente significative delle popolazioni parassitarie (luminali e incistate), la somministrazione in dose singola di MOX ha evidenziato la totale efficacia (R=100%) nei confronti della popolazione luminale di cyathostomini. Tale risultato, sebbene non confortato da significatività statistica ( $p=0,224$ ), è in accordo con la totale efficacia evidenziata dalla MOX nelle prove in vivo (FECR=100%) e sembra confermare le numerose esperienze (Xaio *et al.*, 1994; Monahan *et al.*, 1996; Eysker *et al.*, 1997; Steinbach *et al.*, 2006) che dichiarano questa molecola come altamente efficace nei confronti degli stadi larvali (L4, L5) e degli adulti dei cyathostomini. Rispetto ai soggetti trattati con FBZ per cinque giorni consecutivi, la MOX ha evidenziato nei confronti degli stadi luminali una efficacia significativamente maggiore ( $p=0,041$ ) e prossima alla significatività statistica ( $p=0,055$ ) calcolata rispettivamente nei periodi 70-245 giorni e 70-146 giorni post-trattamento (il confronto MOX vs x5FBZ non è stato possibile a 170-245 giorni post-trattamento, in quanto risultavano disponibili i rilievi *post mortem* relativi ad un solo soggetto del gruppo x5FBZ). Al contrario, l'analisi statistica non ha evidenziato differenze significative tra i conteggi di stadi luminali riscontrati nei soggetti trattati con dose singola di MOX e di FBZ. Tale risultato potrebbe essere spiegato dal lungo intervallo di tempo intercorso tra trattamento e macellazione per numerosi soggetti dei gruppi MOX e x1FBZ. Infatti non è stato possibile effettuare il confronto tra questi gruppi sperimentali a 70-146 giorni post-trattamento (un solo soggetto del gruppo x1FBZ macellato in tale periodo) e la maggioranza di questi animali (5 su 9 del gruppo MOX e 7 su 8 del gruppo x1FBZ) è stata sacrificata dopo 170-245 giorni la somministrazione del farmaco, esponendo ragionevolmente questi

soggetti a ripetute reinfestazioni ed al conseguente annullamento dell'effetto associato ai diversi trattamenti. Tutte queste osservazioni sembrano pertanto indicare come una singola somministrazione di MOX al dosaggio consigliato sia in grado di garantire, nei confronti degli stadi luminali dei cyathostomini, una più alta efficacia del FBZ (anche se somministrato al dosaggio consigliato per 5 giorni consecutivi).

Per quanto riguarda gli stadi larvali incistati (L3 e "grosse" L4), in questo studio non sono state evidenziate differenze statisticamente significative tra trattati e controlli-NT, così come tra i diversi gruppi di trattamento (MOX, x1FBZ, x5FBZ). Questo risultato è molto probabilmente dovuto, come già enunciato, al lungo intervallo di tempo intercorso tra trattamento e rilievi *post mortem*, nel corso dei quali è presumibile che negli animali possano essere state ritrovate popolazioni di larve incistate sviluppatesi a seguito di reinfestazioni (e non solo di larve eventualmente sopravvissute al trattamento).

Mentre la maggior parte (90,3%) degli stadi luminali è risultata localizzata a livello di colon, suggerendo come le azioni patogene esercitate dagli stadi adulti dei cyatostomini interessino principalmente tale tratto del grosso intestino, la popolazione di stadi larvali è risultata pressoché equamente ripartita tra la mucosa del cieco (54,0%) e quella del colon (46,0%); tale risultato indica come le azioni patogene associate alla contemporanea e massiva riattivazione di larve ipobiotiche nel periodo primaverile, causa della temuta cyathostominosi larvale, possano interessare l'intero grosso intestino.

In base a questa esperienza ed alla letteratura disponibile è importante considerare che:

- la MOX risulta attiva sulle larve L4, ma poco o nulla sulle L3 (Xaio *et al.*, 1994; Eysker *et al.*, 1997). Pertanto sarebbe preferibile non utilizzarla nei trattamenti tardo autunnali-invernali (in cui è presumibile, soprattutto nei giovani soggetti, una elevata presenza di larve incistate nella mucosa), ma nel corso di altri periodi dell'anno considerando la sua maggiore efficacia, rispetto al FBZ, nei confronti degli stadi luminali (L4 e adulti). Tuttavia, è importante sottolineare che la MOX, non riuscendo ad uccidere gli stadi più precoci delle larve di piccoli strongili incistate, esercita una pressione selettiva minore verso ceppi resistenti, mantenendo una proporzione maggiore di popolazione (*refugia*) che non entra in contatto con il farmaco (Reinemeyer *et al.*, 2003).

- Il FBZ risulta meno attivo della MOX sugli stadi luminali (L4, L5/adulti), ma sembra avere, se somministrato al dosaggio consigliato per 5 giorni consecutivi, una elevata attività nei confronti delle L3, anche ipobiotiche (Di Pietro *et al.*, 1997). Pertanto queste osservazioni renderebbero più opportuno il suo utilizzo in tardo autunno-inizio inverno, uccidendo buona parte della popolazione larvale e riducendo i rischi di cyathostomiosi larvale. Tuttavia sembra che somministrazioni ripetute di FBZ possano indurre fenomeni di infiammazione della mucosa che “mimano” una cyathostomiosi larvale (Steinbach *et al.*, 2006). Questo aspetto potrà essere ulteriormente indagato grazie alle analisi istologiche e dei mediatori dell’infiammazione (attualmente in fase di avvio) su tutti i campioni di mucosa ottenuti durante i prelievi *post mortem* effettuati in questa esperienza.

In conclusione, per un corretto controllo delle infestazioni da piccoli strongili è indispensabile considerare tutte le osservazioni discusse in questa stesura e relative a due molecole antielmintiche (moxidectina e fenbendazolo) largamente utilizzate nella specie equina, senza dimenticare la necessità di attuare tutte le possibili azioni di profilassi ambientale (vedi paragrafo 2.8.1) e di condurre, aspetto spesso trascurato sia dagli allevatori che dai veterinari, opportuni accertamenti copromicroscopici. Questo al fine di evitare frequenti “trattamenti alla cieca”, valutare l’efficacia delle molecole utilizzate (sarebbe opportuno organizzare FECRT aziendali almeno una volta all’anno) e ridurre il rischio di chemioresistenze preservando l’efficacia delle molecole disponibili sul mercato.



## BIBLIOGRAFIA

Ambrosi M.

Efficacia del trattamento con ivermectina contro i gasterofili, gli ascaridi e gli strongili degli equini. XXXII Congresso SISVet, 1071-1073 (1988).

Ambrosi M.

Parassitologia Zootecnica. Ed. Edagricole Bologna (1995).

Battelli G., Orlandi M.

Ricerche sulla diffusione degli strongili gastro-intestinali in equidi delle Forze Armate. XXXVII Congresso SISVet, 614-616 (1973).

Bauer C., Merkt J., Janke-Grimm G., Burger H.

Prevalence and control of benzimidazole-resistant small strongyles on German thoroughbred studs, Vet. Parasitol. 21 (1986).

Blood D.C., Radostis O. M., Henderson J. A.

Patologia medica veterinaria. Ed. italiana di M. Venturoli, Ed. Garso, Bologna (1983).

Boch J., Supperer R.

Parassitologia clinica veterinaria. Ed. Essegivi, Piacenza (1980).

Boxell A. C., Gibson K. T., Hobbs R. P., Thompson R. C.

Occurrence of gastrointestinal parasites in horses in metropolitan Perth, Western Australia. Aust. Vet. J. 82, 91-95 (2004).

Burger H.J., Bauer C.

Efficacy of four anthelmintics against benzimidazole-resistant cyathostomes of horses, Vet. Rec. 120 (1987).

Cai Y., Zhou J., Webb D.C.

Treatment of mice with fenbendazole attenuates allergic airways inflammation and Th2 cytokine production in a model of asthma (2009).

Campbell A. J. D., Cringoli G., Coles G.C.  
Ivermectin resistance in cyathostomins in UK horses. XXI Congresso internazionale W.A.A.V.P. (World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology; Ghent, Belgio (2007).

Carli, Ormas, Re, Soldani.  
Framacologia Veterinaria. Ed. Idelson Gnocchi (2009).

Chapman M.R., French D.D., Kley T.R.  
Gastrointestinal helminths of ponies in Louisiana: a comparison of species currently prevalent with those present 20 years ago.  
J. Parasitol. 88, 1130-113 (2002).

Chapman M.R., French D.D., Monahan C.M., Klei T.R.  
Identification and characterization of a pyrantel pamoate resistant cyathostome population, Vet. Parasitol. 66 (1996).

Cobb R., Boeckh A.  
Moxidectin: a review of chemistry, pharmacokinetics and use in horses (2009).

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

Coles G.C., Jackson F., Pomroy W.E., Pritchard R.K., von Samson Himmelstjerna G., Silvestre A., Taylor A.M. Vercruysse J.  
The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. Vet Parasitol. 136: 167-185 (2006).

Coles G.C., Roush R.T.  
Slowing the spread of anthelmintic resistant nematodes of sheep and goats in the United Kingdom, Vet. Rec. 130 (1992).

Craven J., Bjorn H., Henriksen S.A., Nansen P., Larsen M., Lendal S.  
Survey of anthelmintic resistance on Danish horse farms, using 5 different methods of calculating faecal egg count reduction, Equine Vet. J. 30 (1998).

Da Silva Anjos D.H., De Lurdas A., Rodrigues M.  
Diversity of the infracommunities of strongylid nematodes in the ventral colon of *Equus caballus* from Rio de Janeiro state, Brazil. *Vet Parasitol.* 136, 167-185 (2006).

DiPietro J.A., Klei T., Reinemeyer C.  
Efficacy of fenbendazole against encysted small strongyle larvae (1997).

Drogemullera M., Failingb K., Schniedera K., von Samson-Himmelstjerna G.  
Effect of repeated benzimidazole treatments with increasing dosages on the phenotype of resistance and the beta-tubulin codon 200 genotype distribution in a benzimidazole-resistant cyathostomin population (2004).

Drudge J.H. e Lyons E.T.  
Internal parasites of equids with emphasis on treatment and control (1986).

Drudge J.H., Lyons E.T., Swerczek T.W., Tolliver S.C.  
Cambendazole for strongyle control in a pony band: selection of a drug-resistant population of small strongyles and teratologic implications, *Am. J. Vet. Res.* 44 (1983).

Drudge J.H., Lyons E.T., Tolliver S.C., Fallon E.H.  
Phenothiazine in the origin of benzimidazole resistance in population-B equine strongyles, *Vet. Parasitol.* 35 (1990).

Drudge J.H.  
Clinical aspects of *Strongylus vulgaris* infections in horse. Emphasis on diagnosis, chemotherapy and prophylaxis. *Vet. Clinics N. Am. Large Animal Pract*, 1, 25, 251-265 (1979).

Drudge J.H., Lyons E.T.  
Control of Internal Parasites of the Horse, *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 148(1966).

Duncan J.L., Abbott E.M., Arundel J.H., Eysker M., Klei T.R., Kreecer R.C., Lyons E.T., Reinemeyer C., Slocombe J.O.D.  
WAAVP: second edition of guidelines for evaluating the efficacy of equine anthelmintics. *Vet. Parasitol.* 103: 1-18 (2002).

Duncan J.L.

Field studies on the epidemiological of mixed strongyle infection in the horse. *Vet Rec.* 95, 337-345 (1974).

Duncan J.L.

*Strongylus vulgaris* in the horse. *Vet Rec.* 95, 34-37 (1974).

Euzeby J.

Les maladies vermineuses des animaux et leur incidence sur la pathologie humaine – tome I: “Maladies dues aux nèmhelminthes” - Fascicule 2, Ed. Vigot, Paris, (1963).

Eysker M., Boersema J.H., Grinwis G.C.M., Kooyman F.N.J. , Poot J.

Controlled dose confirmation study of a 2% moxidectin equine gel against equine internal parasites in the Netherlands (1997).

Eysker M., Boeserma J.H., Kooyman F.N.J.

The effect of ivermectin treatment against inhibited early third stage, late third stage and fourth stage larvae and adult stage of the cyathostomes in Shetland ponies and spontaneous expulsion of these helminths. *Vet. Parasitol.* 42: 295-302 (1992).

Frangipane di Regalbono A., Pozzato A., Simonato G., Beraldo P., Cassini R., Milillo P., Traversa D., Pietrobelli M.

Reliability of the McMaster technique in evaluating the anthelmintic resistance in horse cyathostomins using different flotation solutions and sample dilutions (2009).

Genchi C., Di Sacco B., Traldi G., Bogara B., Quintavalla F.

Prime osservazioni in Italia sulla resistenza dei piccoli strongili del cavallo (Cyathostominae) ai benzimidazolici ed efficacia del pyrantel pamoato. *Ippologia* 3: 77-80 (1992).

Genchi C., Malnati C.

Infestazione naturale del puledro per via galattogena da *Strongyloides westeri*. *Parassitologia* 17: 41-44 (1976).

Giles C.J., Urquhart K.A., Longstaffe J.A.

Larval cyathostomiasis (immature *Trichonema*-induced enteropathy): a report of 15 clinical cases. *Equine Vet. J.* 17, 196-201 (1985).

Gnechi C., Malnati C., Carrara L.

Aspetti epidemiologici di nematodi gastro-intestinali degli animali al pascolo. *Clinica Vet.* 101, 175-184 (1978).

Herd R.P., Coles G.C.

Slowing the spread of anthelmintic resistant nematodes of horses in the United Kingdom, *Vet. Rec.* 136 (1995).

Herd R.P., Miller T.B., Gabel A.A.

A field evaluation of pro-benzimidazole, benzimidazole, and non-benzimidazole anthelmintics in horses, *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 179 (1981).

Herd R.P.

Equine parasite control – problems associated with intensive anthelmintic therapy, *Equine Vet. Educ.* 2 (1990).

Ihler C.F.

A field survey on anthelmintic resistance in equine small strongyles in Norway, *Acta Vet. Scand.* 36 (1995).

Kaplan R.M.

Anthelmintic resistance in nematodes of horses. *Vet. Res.* 33, 491-507 (2002).

Kaplan R.M.

Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends Parasitol.* 20: 477-481 (2004).

Katsuhiko Mizuno, Yasuyuki Toyoda, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, Tsuyoshi Yokoi.

Stimulation of pro-inflammatory responses by mebendazole in human monocytic THP-1 cells through an ERK signaling pathway (2010).

Lichtenfels J.R., Kharchenko V.A., Dvijons G.M.

Illustrated identification key to strongylid parasites (Strongylidae: Nematoda) of horses, zebras and asses (Equidae). *Vet. Parasitol.* 156, 4-161 (2008).

Lyons E., Tolliver S., Drudge J., Stamper S., Swerczek T., Granstrom D.  
A study (1977- 1992) of population dynamics of endoparasites featuring benzimidazole-resistant small strongyles (population S) in Shetland ponies, *Vet. Parasitol.* 66 (1996).

Lyons E.T., Tolliver S.C., Collins S.S.  
Reduced activity of moxidectin and ivermectin on small strongyles in young horses on a farm (BC) in Central Kentucky in two field tests with notes on variable counts of eggs per gram of feces (EPGs). Gennaio 2011.

Lyons E.T., Tolliver S.C., Collins S.S., Ionita M. , Kuzmina T.A., Rossano M.  
Field tests demonstrating reduced activity of ivermectin and moxidectin against small strongyles in horses on 14 farms in Central Kentucky in 2007–2009. Settembre 2010.

Lyons E.T., Tolliver S.C., Drudge J.H., Collins S.S., Swerczek T.W.  
Continuance of studies on Population S benzimidazole-resistant small strongyles in a Shetland pony herd in Kentucky: effect of pyrantel pamoate (1992-1999), *Vet. Parasitol.* 94 (2001).

Lyons E.T., Tolliver S.C., Drudge J.H.  
Historical prospective of cyathostomes: prevalence, treatment and control programs. *Vet. Parasitol.* 85: 97-112 (1999).

Matthews J.B.  
An unpdate on cyathostomins: anthelmintic resistance and worm control. *Equine Vet. Ed.* 20, 552-560 (2008).

Milillo P., Cobb R., Boeckh A., Otranto D., Lia R.P.,Perrucci S., Frangipane di regalbono A., Berando P., Bartolini R., Traversa D.  
Diffusione dei piccoli strongili di cavallo in Italia: prevalenza ed identificazione molecolare. *Ippologia* 4, 1-8 (2009).

Molento M.B., Antunes J., Bentes R.N., Coles G.C.  
Anthelmintic resistant nematodes in Brazilian horses. *Vet. Rec.* 162, 384-385 (2008).

Monahan C.M., Chapman M.R., Taylor H.W., French D.D., Klei T.R.  
Foals raised on pasture with or without daily pyrantel tartrate feed additive: comparison of parasite burdens and host responses following experimental challenge with large and small strongyle larvae, *Vet. Parasitol.* 73 (1997).

Monahan C.M., Chapman M.R., Taylor H.W., French D.D., Klei T.R..  
Comparison of moxidectin oral gel and ivermectin oral paste against a spectrum of internal parasites of ponies with special attention to encysted cyathostome larvae (1996).

NAHMS, Equine '98, Part I: Baseline reference of 1998 equine health and management, National Animal Health Monitoring System, USDA: APHIS: VS, 1998, Fort Collins.

Niles C. Kyvsgaad et al.  
Prevalence of strongyles and efficacy of fenbendazole and ivermectin in working horses in El Sauce, Nicaragua. *Vet. Parasitol.* 2011

Ogbourne C.P.  
Survival on herbage plots of infective larvae of strongylid nematodes of horses. *J. Helminthol* 47, 9 (1973).

Ogbourne C.P.  
The prevalence, relative abundance and site distribution of nematodes of the subfamily Cyathostominae in horses killed in Britain. *J. Helminthol* 50, 203-214 (1976).

Orlandi V.  
Indagini sull'allevamento e sulle elmintiasi gastro-intestinali degli equidi nelle province di Ascoli-Piceno e Macerata. *Clinica Vet.* 103, 396-404 (1980).

Osterman Lind E., Eysker M., Nilsson O., Uggla A., Höglund J.  
Expulsion of small strongyle nematodes (cyathostomin spp) following deworming of horses on a stud farm in Sweden (2003).

Pietrobelli M., Schiff D., Battelli G., Giordani A.  
Indagine sulla parassitosi intestinali degli equidi nella provincia di Udine. *Archivio Veterinario Italiano*, 46(6), 225-232 (1995).

Pilo C., Altea A., Nicolussi P., Scala A.  
Aggiornamenti sulla presenza e sul ruolo patogeno di *Strongylus vulgaris* nei cavalli in sardegna. LXIII Congresso SISVet, 16-18 settembre, Udine, 171-173 (2009).

Pozzato A.  
Valutazione dell'antelmintico resistenza dei piccoli strongili (Nematoda: Cyathostominae) in allevamenti equini del Nord-Est Italia (2009).

Prichard R., Rao V., Siddiqui S., James C., Forrester S.  
Studies on the mechanisms of action of moxidectin and ivermectin.  
Report on file, (2009).

Reinemeyer C.R., Farley A.W., Clymer B.C.  
Comparisons of cyathostome control and selection for benzimidazole resistance using larvicidal regimens of moxidectin gel or fenbendazole paste. *The International Journal of Applied Research* (2003).

Reinemeyer C.R., Smith S.A., Gabel A.A., Herd R.P.  
The prevalence and intensity of internal parasites of horses in USA. *Vet. Parasitol.* 15, 75-83 (1984).

Reinemeyer C.R.  
Indication and benefits of moxidectin use in horses. In proceedings of World Equine Veterinary Association. Buenos Aires, Argentina (2003).

Reinemeyer C.R.  
Small Strongyles: recent advances. *Vet. Clin. Nth. Am.* 2, 281-312 (1986).

Rew R.S., Fetterer R.H.  
Mode of action of antinematodal drugs.  
In: Campbell W.C., Rew R.S. (Eds.), *Chemotherapy of Parasitic Diseases*, Plenum Publishing Company, New York (1986).

Sangster N.C.  
Pharmacology of anthelmintic resistance in cyathostomes: will it occur with the avermectin/milbemycins?, *Vet. Parasitol.* 85 (1999).

Slocombe J.O.D.

Pathogenesis of elminths in equine. *Vet. Parasitol.* 18: 139-153 (1985).

Sloss M. W., Kemp R. L., Zajac A. M.

*Veterinary Clinical Parasitology*. 6<sup>th</sup> ed. Iowa State University Press, USA. pp. 1 – 16 (1994).

Steinbach T., Bauer C., Sasse H., Baumgartner W., Rey-Moreno C., Hermosilla C., Damriyasa I.M., Zahner H.

Small strongyle infection: Consequences of larvicidal treatment of horses with fenbendazole and moxidectin. *Veterinary Parasit* (2006).

Tarigo-Martinie J.L., Wyatt A.R., Kaplan R.M.

Prevalence and clinical implications of anthelmintic resistance in cyathostomes of horses, *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 218 (2001).

Tassi P., Widenhorn.

Indagine orientativa sulla distribuzione delle strongilosi gastro-intestinali di bovini, ovini, caprini, equidi e suini in Italia. *Parassitologia*, 14, 381-389 (1972).

Tolliver S.C., Lyons E.T., Drudge J.H., Stamper S., Granstrom D.E.

Critical tests of thiabendazole, oxiabendazole, and oxfendazole for drug resistance of population-B equine small strongyles (1989 and 1990), *Am. J. Vet. Res.* 54 (1993).

Thompson.

The future of veterinary parasitology: a time for change?. *Vet. Parasitol.* 98: 41-51 (2001).

Traversa D., Iorio R., Fioravante P.I., Bartolini R., Costanzo F., Klei T.R.

Valutazione dell'efficacia dell'oxibendazolo e della moxidectina nei confronti di cyathostomini resistenti al fenbendazolo. *Ippologia*, 18, 1 (2007).

Traversa D., von Samson-Himmelstjerna G., Demeler J., Milillo P., Schurmann S., Barnes H., Otranto D., Perrucci S., Frangipane di Regalbono A., Beraldo P., Boeckh A., Cobb R.

Anthelmintic resistance in cyathostomin population from horse yards in Italy, UK and Germany. *Parasites & Vectors*, 2 (suppl.2) (2009).

Uhlinger C.A., Kristula M.

Effects of alternation of drug classes on the development of oxi-bendazole resistance in a herd of horses, J. Am. Vet. Med. Assoc. 201 (1992).

Uhlinger C.A.

Uses of fecal egg count data in equine practice. Compend. Contin. Educ. Pract. Vet. 15 (1993).

Urquhart G.M., Armour J., Duncan J.L., Jennings F.W.

Veterinary Parasitology. Longman Scientific and Technical, Essex, England (1992).

VanWyk J.A.

Refugia – overlooked as perhaps the most potent factor concerning the development of anthelmintic resistance, Onderstepoort J. Vet. Res. 68 (2001).

Von Samson – Himmelstjerna G., von Fritzen B., Demeler J., Shurmann S., Rohn K., Shieder T., Epe C.

Cases of reduced cyathostomin egg reappearance period and failure of *Parascaris equorum* egg count reduction following ivermectin treatment as well as survey on pyrantel efficacy on German horse farms. Vet. Parasitol. 144: 74-78 (2007).

Von Samson-Himmelstjerna G., von Witzendorff C., Sievers G., Schnieder T.

Comparative use of faecal egg count reduction test, egg hatch assay and beta-tubulin codon 200 genotyping in small strongyles (cyathostominae) before and after benzimidazole treatment (2002).

Woods T.F., Lane T.J., Zeng Q.Y., Courtney C.H.

Anthelmintic resistance on horse farms in north central Florida, Equine Pract. 20 (1998).

