



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI
“FEDERICO II”**



Tesi di Dottorato

**Le principali elmintosi dell'asino in Italia:
epidemiologia, gestione e controllo**

Coordinatore

Ch.mo Prof.
Giuseppe Cringoli

Candidato

Dott.
Buono Francesco

Tutor

Ch.mo Prof.
Vincenzo Veneziano

*L'educazione è il grande motore dello sviluppo personale.
È grazie all'educazione che la figlia di un contadino può diventare
medico, il figlio di un minatore il capo miniera o un bambino nato in una
famiglia povera il Presidente di una grande Nazione.
Non c'è che viene dato, ma la capacità di valorizzare al meglio ciò che
abbiamo è ciò che distingue una persona dall'altra
(Nelson Mandela)*

Lista delle abbreviazioni.....	15
Lista delle figure.....	17
Lista delle tabelle.....	21
Lista dei grafici.....	23
Abstract.....	25
Introduzione.....	31
Capitolo 1	39
1.1 Cenni sull'addomesticamento dell'Asino	41
1.2 Consistenza della popolazione asinina in Italia.....	45
1.3 Principali razze asinine in Italia	47
<i>1.3.1 Asino Ragusano</i>	<i>47</i>
<i>1.3.2 Asino Amiatino</i>	<i>49</i>
<i>1.3.3 Asino Sardo</i>	<i>51</i>
<i>1.3.4 Asino di Martina Franca</i>	<i>53</i>
<i>1.3.5 Asino Romagnolo</i>	<i>55</i>
<i>1.3.6 Asino dell'Asinara</i>	<i>57</i>
<i>1.3.7 Asino Viterbese</i>	<i>59</i>
<i>1.3.8 Asino Pantesco</i>	<i>61</i>
<i>1.3.9 Grigio Siciliano o Asino Ferrante</i>	<i>64</i>
<i>1.3.10 Razze italiane minori ed in via di estinzione</i>	<i>65</i>
<i>1.3.10.1 Asino dei Monti Lepini.</i>	<i>65</i>
<i>1.3.10.2 Asino Calabrese</i>	<i>65</i>
<i>1.3.10.3 Altre razze minori</i>	<i>67</i>
1.4 Utilizzo dell'asino in Italia	68
<i>1.4.1 Produzione di latte</i>	<i>68</i>
<i>1.4.2 Produzione di carne</i>	<i>71</i>

1.4.3 Terapia Assistita con gli Animali	73
Bibliografia.....	75
Capitolo 2	79
2.1 Introduzione.....	81
2.2 Ordine Strongylida: Superfamiglia Strongyloidea	87
2.2.1 <i>Ciclo biologico</i>	91
2.2.1.1 <i>Grandi strongili</i>	91
2.2.1.2 <i>Piccoli strongili</i>	93
2.2.2 <i>Patogenesi e segni clinici</i>	94
2.2.3 <i>Epidemiologia</i>	98
2.2.4 <i>Diagnosi</i>	105
2.3 Ordine Strongilyda: Superfamiglia Trichostrongyloidea	108
2.3.1 <i>Trichostrongylus axei</i>	108
2.3.1.1 <i>Ciclo biologico</i>	108
2.3.1.2 <i>Patogenesi e segni clinici</i>	109
2.3.2 <i>Dictyocaulus arnfeldi</i>	109
2.3.2.1 <i>Ciclo biologico</i>	109
2.3.2.2 <i>Patogenesi e segni clinici</i>	110
2.3.2.3 <i>Epidemiologia</i>	110
2.3.2.4 <i>Diagnosi</i>	113
2.4 Ordine Ascaridida.....	115
2.4.1 <i>Ciclo biologico</i>	116
2.4.2 <i>Patogenesi e segni clinici</i>	117
2.4.3 <i>Epidemiologia</i>	119
2.4.4 <i>Diagnosi</i>	122
2.5 Ordine Oxyurida.....	125
2.5.1 <i>Ciclo biologico</i>	126
2.5.2 <i>Patogenesi e segni clinici</i>	128
2.5.3 <i>Epidemiologia</i>	128

2.5.4 <i>Diagnosi</i>	130
2.6 Ordine Rhabditida	132
2.6.1 <i>Ciclo biologico</i>	132
2.6.2 <i>Patogenesi e segni clinici</i>	133
2.6.3 <i>Epidemiologia</i>	134
2.6.4 <i>Diagnosi</i>	135
2.7 Ordine Cestoda	137
2.7.1 <i>Ciclo Biologico</i>	138
2.7.2 <i>Patogenesi e segni clinici</i>	138
2.7.3 <i>Epidemiologia</i>	139
2.7.4 <i>Diagnosi</i>	141
2.8 Ordine Trematoda	146
2.8.1 <i>Patogenesi</i>	146
2.8.2 <i>Epidemiologia</i>	147
Bibliografia	150
Capitolo 3	171
3.1 <i>Introduzione</i>	173
3.2 <i>Farmaci antiparassitari</i>	174
3.2.1 <i>Tetraidropirimidinici</i>	174
3.2.2 <i>Benzimidazolici</i>	177
3.2.3 <i>Lattoni macrociclici (avermectine e milbemicine)</i>	179
3.3 <i>Proprietà dei farmaci antiparassitari</i>	186
3.4 <i>Tipologia dei trattamenti antiparassitari</i>	186
3.4.1 <i>Interval-dose program (trattamento soppressivo)</i>	187
3.4.2 <i>Strategic dosing (trattamento strategico)</i>	187
3.4.3 <i>Continuous, daily treatment (somministrazione quotidiana)</i> ..	187
3.4.4 <i>Selective therapy (trattamento selettivo)</i>	188
3.5 <i>I trattamenti antiparassitari nell'asino</i>	193
Bibliografia	202

Capitolo 4	213
4.1 Introduzione.....	215
4.2 Test per la determinazione dell'antelmintico resistenza	216
4.2.1 <i>Test in vivo</i>	217
4.2.1.1 <i>Metodi di monitoraggio della FECs</i>	217
4.2.1.2 <i>Faecal Egg Count Reduction Test (FECRT)</i>	229
4.2.1.3 <i>Controlled Test</i>	232
4.2.1.4 <i>Critical Test</i>	232
4.2.2 <i>Test in vitro</i>	233
4.2.2.1 <i>Egg hatch test (EHT)</i>	233
4.2.2.2 <i>Larval Development Test (LDT) e Micro Agar Larval Development Test (MALDT)</i>	234
4.2.2.3 <i>Larval feeding inhibition test (LFIT)</i>	234
4.2.2.4 <i>Larval migration inhibition test (LMIT)</i>	235
4.3 <i>Egg Reappearance Period (ERP)</i>	235
4.4 Strategie di controllo	236
4.4.1 <i>Refugia</i>	237
4.4.2 <i>Stadi immaturi dei nematodi</i>	239
4.4.3 <i>Frequenza dei monitoraggio FEC</i>	240
4.4.4 <i>Gestione del pascolo</i>	240
4.4.5 <i>Quarantena</i>	241
4.4.6 <i>Utilizzo di funghi nematofagi</i>	241
4.5 L'antelmintico resistenza nel cavallo	243
4.6 L'antelmintico resistenza nell'asino.....	245
Bibliografia.....	249
Capitolo 5	259
5.1 Introduzione.....	261
5.2 Materiali e Metodi	261
5.2.1 <i>Area di Studio</i>	261

5.2.2 Estrazione del campione e Questionnaire survey	262
5.2.3 Animali oggetto di Studio	263
5.2.3 Prelievo dei campioni di feci.....	263
5.2.4 Tecniche coprologiche quali-quantitative.....	264
5.2.5 Esami coproculturali	267
5.3 Analisi statistica	267
5.4 Risultati	267
5.4.1 Questionnaire survey.....	267
5.4.2 Esami di laboratorio – Indagine coprologica	272
5.5 Discussioni e conclusioni	282
Bibliografia.....	289
Capitolo 6	293
6.1 Introduzione.....	295
6.2 Il mebendazolo	295
6.3 Materiali e metodi	296
6.3.1 Animali oggetto di studio	296
6.3.2 Gruppi sperimentali	298
6.3.3 Trattamenti antiparassitari	299
6.3.4 Procedure di campionamento.....	299
6.3.5 Procedure analitiche	301
6.3.6 Validazione della metodica analitica	302
6.3.7 Analisi parassitologiche: valutazione dell'efficacia antelmintica ed egg reappearance period (ERP).....	302
6.3.8 Farmacocinetica ed analisi statistica dei dati	304
6.4 Risultati	305
6.4.1 Parametri farmacocinetici.....	305
6.4.2 Quadro parassitologico.....	306
6.4.3 Coproculture	309
6.5 Discussioni e conclusioni	310

Bibliografia.....	314
Capitolo 7	317
7.1 Introduzione.....	319
7.2 Materiali e metodi	320
7.2.1 <i>Quadro parassitologico aziendale e peso degli animali</i>	321
7.2.2 <i>Gruppi sperimentali</i>	321
7.2.3 <i>Trattamenti antiparassitari</i>	322
7.2.4 <i>Analisi parassitologiche – Valutazione dell’Efficacia Antielmintica</i>	323
7.2.5 <i>Esami coprologici</i>	324
7.2.5.1 <i>FEC (Faecal Egg Count)</i>	324
7.2.5.2 <i>Esami coprocolturali</i>	325
7.2.5.3 <i>FECRT ed ERP</i>	326
7.3 Risultati	327
7.4 Discussioni e conclusioni	338
Bibliografia.....	344
Capitolo 8	347
APPENDICE I: <i>Questionnaire survey proposta in azienda</i>	349
APPENDICE II: <i>Nomogramma per la determinazione del peso degli asini</i>	352
APPENDICE III: <i>Guida alla determinazione dell’età degli asini</i>	353
APPENDICE IV: <i>Guida alla determinazione del BCS</i>	354
APPENDICE V: <i>Tecniche di laboratorio</i>	357
Conteggio in camera McMaster	357
Flottazione delle uova di anaplocefalidi degli equini (Proudman e Edwards, 1992).....	359
Sedimentazione in acqua	360
Sedimentazione con apparato di Baermann	361
Coprocoltura.....	362

Al termine di questi tre anni desidero ringraziare tutte le persone che mi hanno accompagnato in questo percorso e senza le quali non sarebbe stato possibile concludere al meglio questo iter.

Ringrazio sinceramente il mio Tutor, Prof. Vincenzo Veneziano per avermi dato la possibilità di entrare a contatto con il mondo della ricerca e per avermi guidato in questo percorso trasmettendomi l'amore verso questa materia. Lo ringrazio oltretutto per avermi fornito infiniti strumenti di crescita, spronandomi sempre e con ogni mezzo ad un miglioramento professionale ma soprattutto personale.

Ringrazio il Prof. Giuseppe Cringoli, coordinatore del dottorato di ricerca in Scienze Veterinarie al quale porgo la mia stima per la sua incessante passione verso la Ricerca.

Ringrazio il Prof. Diego Piantedosi, la cui disponibilità e voglia di collaborazione e crescita professionale non si è mai limitata all'argomento di tesi.

Ringrazio il Prof. Alessandro Fioretti ed il suo Gruppo di Ricerca con i quali ho condiviso scambi di idee e momenti di ilarità.

Ringrazio tutti i colleghi e amici del XXX ciclo di Dottorato con cui ho condiviso lezioni, impegni, frustrazioni, ma soprattutto soddisfazioni.

Durante questo percorso non sono mancate collaborazioni con professionisti esterni che hanno contribuito, anche semplicemente tramite il loro parere scientifico, alla stesura di questo elaborato. Innanzitutto ringrazio la Prof.ssa Fabrizia Veronesi per il supporto nell'elaborazione dei dati.

Inoltre un ringraziamento speciale al Dr. Antonio Fagiolo e la Dr.ssa Cristina Roncoroni per l'impegno, la costanza, la serietà nello svolgere il loro lavoro ma soprattutto per l'infinita disponibilità e la capacità di aver reso i momenti lavorativi più leggeri.

Rinnovo il ringraziamento a coloro i quali hanno messo a disposizione le loro aziende e che hanno abbracciato il nostro progetto di ricerca. Il Dr. Paolo Botta ed il "Centro Regionale di Incremento Ippico" di Santa Maria Capua Vetere (CE); il "Rifugio degli Asinelli" e "The Donkey

Sanctuary” che da anni credono vivamente nel nostro lavoro e nel ruolo della ricerca per il benessere degli animali.

Ringrazio l’Equilab dove si sono svolte le attività di laboratorio. Nello specifico Grazie a Giovanni Sgroi e tutti i tesisti che in qualche modo hanno fatto parte del mio percorso formativo.

Grazie a Benedetto Neola, per anni collaboratore, confidente e amico.

Grazie a Laura Pacifico, collega ma soprattutto amica, senza la quale questo lavoro di tesi non sarebbe stato possibile. Grazie per avermi ascoltato, supportato e consigliato nei momenti difficili professionali e soprattutto personali.

Grazie a Luigi, amico da sempre, che con le sue critiche mi ha aiutato a essere migliore.

Grazie a Roberto Masucci mentore da una vita ma soprattutto amico.

Grazie a Cristina Caiazzo per i piacevoli momenti di spensieratezza.

Grazie alla mia famiglia, a mio padre, mia madre ed i miei fratelli senza dei quali nulla sarebbe possibile.

Infine Grazie a Francesca, mia compagna, che in poco tempo ha rivoluzionato la mia vita, rendendola più felice e insegnandomi come il lavoro e questo percorso siano solo il contorno.

a.C.	Avanti Cristo
AAEP	<i>American Association of Equine Practitioners</i>
ABM	Abamectina
ABZ	Albendazolo
Ach	Actilcolina
AIA	Associazione Italiana Allevatori
APA	Associazione Provinciale Allevatori
APLV	Allergia alle proteine del latte vaccino
AR	Antileminto Resistenza
AUC	Area al di sotto della curva di concentrazione
BCS	<i>Body Condition Score</i>
BZ	Benzimidazolici
C _{max}	Concentrazione massima
CBZ	Cabendazolo
CY	Cyathostominae
CPG	Cisti per grammo di feci
DRM	Doramectina
DS	Deviazione Standard
EL3	<i>Early third stage larvae</i>
EHT	<i>Egg Hatch Test</i>
EPM	Eprinomectina
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FBT	Febantel
FBZ	Fenbendazolo
FBZ.SO	Ossifendazolo
FEC	<i>Faecal egg count</i>
FECR	<i>Faecal egg count reduction</i>
FECRT	<i>Faecal egg count reduction test</i>
GABA	Acido γ -amminobutirrico
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
IVM	Ivermectina
L1	Larva di primo stadio
L2	Larva di secondo stadio
L3	Larva di terzo stadio
L4	Larva di quarto stadio
L5	Larva di quinto stadio
LDT	<i>Larval Development Test</i>
LFIA	<i>The larval feeding inhibition assay</i>
LM	Lattoni macrociclici

Lista delle abbreviazioni

LMIA	<i>The larval migration inhibition assay</i>
LPG	Larve per grammo di feci
MALDT	<i>Micro Agar Larval Development Test</i>
MBZ	Mebendazolo
mg	Microgrammi
MOX	Moxidectina
nm	Nanometri
OBZ	Ossibendazolo
OPG	Oocisti per grammo di feci
OS	Via orale
P.V.	Peso vivo
PYR	Pyrantel
PZQ	Praziquantel
RPM	Giri al minuto
SF	Soluzione flottante
SI	Strongili intestinali
SLM	Selamectina
SNC	Sistem nervoso centrale
T _{max}	Tempo massimo
TBZ	Tioabendazolo
UPG	Uova per grammo di feci
USA	United State of America
WAAVP	<i>World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology</i>
°C	Gradi Centigradi
µg	Microgrammi

- 1.1 Asini nel complesso mortuario di Abydos
- 1.2 Età della pietra. Piccolo asino selvatico. Graffito di Levanzo
- 1.3 Mastaba di Asketep. Bassorilievo egizio su calcare del 2500 a.C.
Asini di tipo nubiano addomesticato per impieghi agricoli
- 1.4 Asino Ragusano e la sua distribuzione in Italia
- 1.5 Asino Amiatino e la sua distribuzione in Italia
- 1.6 Asino Sardo e la sua distribuzione in Italia
- 1.7 Asino di Martina Franca e la sua distribuzione in Italia
- 1.8 Asino Romagnolo e la sua distribuzione in Italia
- 1.9 Asino dell'Asinara e la sua distribuzione in Italia
- 1.10 Asino Viterbese e la sua distribuzione in Italia
- 1.11 Cartolina con contadina siciliana che monta in modalità "antica amazzone" su un asino Pantesco
- 1.12 Asino Pantesco e la sua distribuzione in Italia
- 1.13 Grigio Siciliano e la sua distribuzione in Italia
- 1.14 Asino dei Monti Lepini
- 1.15 Asino Calabrese
- 1.16 The Donkey Sanctuary - Devon. Attività di onoterapia
- 2.1 Sezione trasversale di un nematode femmina
- 2.2 Sezione longitudinale di un nematode femmina
- 2.3 Sezione longitudinale della porzione caudale un nematode maschio
- 2.4 Sezione longitudinale di un trematode digeneo
- 2.5 Struttura di un cestode ciclofillideo: scolice, collo e strobila.
- 2.6 Struttura di un cestode ciclofillideo: proglottide matura con gli apparati riproduttivi.
- 2.7 Caratteristiche della capsula buccale degli SI
- 2.8 Sezione trasversale dell'arteria mesenterica craniale con larve di *S. vulgaris*
- 2.9 Uovo di strongilo intestinale all'esame coprologico per flottazione (40x)
- 2.10 Larva di 1° stadio di *Dictyocaulus arnfieldi* e uova di SI (20x)
- 2.11 Elminta adulto di *Parascaris* spp.
- 2.12 Ostruzione intestinale da ascaridi in puledro in seguito a trattamento antielmintico
- 2.13 Uovo di *Parascaris* spp. all'esame coprologico per flottazione (40x)
- 2.14 *Oxyruis equi* raccolti durante una esplorazione rettale

- 2.15 *Oxyuris equi* - aggregati di uova in fluidi mucosi nella regione perianale di un asino
- 2.16 Uovo di *Oxyruis equi* all'esame coprologico per flottazione (40x)
- 2.17 Uovo di *Strongyloides westeri* all'esame coprologico per flottazione (40x)
- 2.18 Uovo di *Anoplocephala* spp. all'esame coprologico per flottazione (40x)
- 3.1 Formula di struttura del Pyrantel pamoato
- 3.2 Formula di struttura del Pyrantel tartrato
- 3.3 Formula di struttura di base dei benzimidazolici
- 3.4 Formula di struttura di base delle Avermectine e Milbemicine
- 3.5 Schema di trattamenti selettivi nell'asino basato sulla FEC
- 4.1 Selezione per l'antielmintico resistenza nei nematodi
- 4.2 Camera McMaster
- 4.3 Componenti dell'apparato FLOTAC.
- 4.4 FLOTAC: reticoli di lettura
- 4.5 Le due versioni dell'apparato FLOTAC
- 4.6 Accessori dell'apparato FLOTAC.
- 4.7 Processo completo dell'assemblaggio del FLOTAC che mostra i componenti di base e gli accessori
- 4.8 Mini-FLOTAC componenti
- 4.9 Fill-FLOTAC
- 4.10 Rappresentazione schematica del concetto di refugia nell'asino
- 5.1 Esplorazione rettale ad un asino per prelievo copros
- 5.2 Camere di McMaster
- 5.3 Lettura al microscopio di camera McMaster
- 5.4 Esecuzione del Proudman Test
- 5.5 Sedimentazione per la ricerca delle uova di trematodi
- 6.1 Formula di struttura del Mebendazolo
- 6.2 Identificazione degli animali mediante targhetta numerata
- 6.3 Animali oggetto della prova
- 6.4 Prelievo dei campioni di latte
- 6.5 Larva di 3° stadio di *Cyathostominae*
- 7.1 Misurazione circonferenza toracica per determinazione del peso
- 7.2 Prelievo di feci dall'ampolla rettale
- 7.3 Incubazione campioni di feci per consentire lo sviluppo della L3
- 7.4 Larva di terzo stadio di *Cyathostominae*
- 7.5 Larva di terzo stadio di *S. vulgaris*

- 1.1 Consistenza delle popolazioni delle principali razze asinine italiane
- 1.2 Dati Biometrici dell'asino Ragusano
- 1.3 Dati Biometrici dell'asino Amiantino
- 1.4 Dati Biometrici dell'asino Sardo
- 1.5 Dati biometrici dell'Asino di Martina Franca
- 1.6. Dati biometrici dell'asino Romagnolo
- 1.7 Dati biometrici dell'asino dell'Asinara
- 1.8 Dati biometrici dell'asino Viterbese
- 1.9 Dati biometrici dell'asino Pantesco
- 1.10 Razze minori presenti in Italia
- 1.11 Composizione chimica e proprietà fisiche del latte di asina, cavalla, bovina e donna
- 1.12 Caratteristiche chimiche del muscolo *Longissimus thoracis* di asino
- 2.1 Classificazione della superfamiglia Strongyloidea
- 2.2 Temperatura e sviluppo delle larve di strongili intestinali dalla schiusa a L3
- 2.3 La sopravvivenza degli stadi larvali a vita libera degli strongili degli equini, esposti a differenti condizioni climatiche.
- 2.4 Prevalenza degli SI nel corso di indagini coprologiche in asini
- 2.5 Specie e generi di strongili gastro-intestinali (espressi in percentuale %) riscontrati in seguito ad esami coprocolturali o postmortem negli asini
- 2.6 Caratteristiche morfologiche della L3 degli Strongili Intestinali degli equidi
- 2.7 Prevalenza di *Dictyocaulus arnfieldi* nel corso di indagini coprologiche in asini
- 2.8 Prevalenza di *Parascaris* spp. nel corso di indagini coprologiche in asini
- 2.9 Prevalenza di *Oxyuris equi* nel corso di indagini coprologiche in asini
- 2.10 Prevalenza di *Strongyloides westeri* nel corso di indagini coprologiche in asini
- 2.11 Prevalenza di *Anoplocephalidae* nel corso di indagini coprologiche in asini
- 2.12 Rappresentazione schematica degli studi di validazione condotti con differenti tecniche coprologiche per la diagnosi di uova di *Anoplocephala perfoliata*

- 2.13 Prevalenza di *Fasciola hepatica* nel corso di indagini coprologiche in asini
- 3.1 Antelmintici per equini disponibili in Italia
- 3.2 Linee guide per la classificazione dei cavalli nelle differenti categorie in base all'eliminazione delle UPG e la percentuale attesa della popolazione equina appartenente a ogni categoria
- 3.3 Classificazione degli asini nelle differenti categorie in base all'eliminazione delle UPG
- 4.1 Differenti metodiche per la determinazione della FEC negli equidi
- 4.2 Soluzioni flottanti
- 4.3 Valori suggeriti dalla AAEP Parasite Control Guidelines per l'interpretazione del FECRT negli strongili intestinali
- 4.4 Fattori che influenzano il FECRT nel cavallo
- 4.5 *Cyathostominae* egg reappearance period (ERP) per gli antelmintici per equini
- 4.6 Reports di riduzione del Egg Reappearance Period in CY dopo trattamento con LM nel cavallo
- 4.7 Reports di resistenza ai LM di *Parascaris* spp. nel cavallo
- 5.1 Risultati degli esami coprologici quali-quantitativi delle aziende oggetto di studio
- 5.2 Risultati degli esami coprologici quali-quantitativi degli asini oggetto di studio
- 5.3 Intensità dell'infezione da SI in base alle UPG
- 5.4 Risultati della regressione logistica univariata e multivariata per valutare l'associazione tra l'infezione da SI e le variabili valutate con la questionnaire survey
- 5.5 Risultati della regressione logistica univariata e multivariata per valutare l'associazione tra l'infezione da *Parascaris* spp. e le variabili valutate con la questionnaire survey
- 6.1 *Cyathostominae* egg reappearance period
- 6.2 Media (\pm DS) dei parametri farmacocinetici del MBZ nel plasma e nel latte in seguito a somministrazione per os agli asini al dosaggio di 10 mg/kg e 20 mg/kg
- 6.3 Risultati esami coprologici pre e post trattamento in asini naturalmente infettati da *cyathostominae*
- 7.1 Valori suggeriti dalla AAEP Parasite Control Guidelines per l'interpretazione del FECR negli strongili intestinali

- 7.2 *Cyathostominae* egg reappearance period (ERP) per gli antelmintici per equini
- 7.3 Efficacia del PYR nell'azienda "A"
- 7.4 Efficacia del FBZ nell'azienda "A"
- 7.5 Efficacia dell'IVM nell'azienda "A"
- 7.6 Efficacia della MOX nell'azienda "A"
- 7.7 Efficacia del PYR nell'azienda "B"
- 7.8 Efficacia del FBZ nell'azienda "B"
- 7.9 Efficacia dell'IVM nell'azienda "B"
- 7.10 Efficacia della MOX nell'azienda "B"
- 8.1 Caratteristiche e definizioni del BCS

- 1.1 Popolazione asinina in Italia dagli anni '60 ad oggi (ISTAT ed AIA)
- 5.1 Età degli asini nelle aziende oggetto di studio
- 5.2 Utilizzo degli asini nelle aziende oggetto di studio
- 5.3 Frequenza del pascolo degli asini nelle aziende oggetto di studio
- 5.4 Specie animali al pascolo nelle aziende oggetto di studio
- 5.5 Numero dei trattamenti antielmintici/anno degli asini nelle aziende oggetto di studio
- 5.6 Antelmintici somministrati agli asini nelle aziende oggetto di studio
- 6.1 Media (\pm DS) della concentrazione nel plasma e nel latte (μ g/g) vs curva temporale del MBZ in seguito a somministrazione per os al dosaggio di 10 mg/kg e 20 mg/kg.
- 6.2 Andamento della eliminazione delle uova nei differenti gruppi sperimentali.
- 7.1 Azienda A: valori ERP del PYR cut off 80%
- 7.2 Azienda A: valori ERP del FBZ cut off 80%
- 7.3 Azienda A: valori ERP dell' IVM cut off 90%
- 7.4 Azienda A: valori ERP della MOX cut off 90%
- 7.5 Azienda B: valori ERP del PYR cut off 80%
- 7.6 Azienda B: valori ERP del FBZ cut off 80%
- 7.7 Azienda B: valori ERP della IVM cut off 90%
- 7.8 Azienda B: valori ERP della MOX cut off 90%

In Italia, sebbene negli anni '60 la specie asinina era rappresentata da poco più di 23.000 esemplari, nell'ultimo decennio, grazie all'utilizzo di questo animale per la produzione di alimenti destinati al consumo umano (latte e carne), nella pet-therapy e come animale da compagnia, la popolazione asinina è più che triplicata, contando nell'anno 2017, 80.421 soggetti iscritti all'anagrafe equina. Differentemente da quanto avviene per il cavallo, l'asino è sempre stato considerato una specie forte e resistente e ciò ha portato a credere che questa specie animale non richieda particolari cure veterinarie. Tuttavia è stato dimostrato che l'asino può essere interessato da numerosi quadri patologici; tra questi, le malattie parassitarie sono ampiamente diffuse e possono compromettere gravemente la salute e le performances produttive di questo animale.

In Italia le elmintosi nell'asino sono poco studiate e le indagini epidemiologiche volte a determinare la prevalenza delle endoparassitosi nella specie asinina nel nostro Paese sono piuttosto scarse; inoltre, a oggi, le molecole registrate per l'utilizzo negli asini sono piuttosto limitate e le informazioni disponibili circa la farmacocinetica dei farmaci antiparassitari sono scarse.

Proprio per questi motivi gli obiettivi di questo percorso di studio di Dottorato di Ricerca in Scienze Veterinarie XXX ciclo sono stati quelli di i) valutare, attraverso una questionnaire survey le differenti pratiche di allevamento e management delle aziende asinine in Italia prestando particolarmente attenzione ai trattamenti antiparassitari; ii) valutare il quadro parassitologico di 77 aziende appartenenti a 13 regioni del territorio italiano, prestando particolare interesse alle elmintosi intestinali e i fattori di rischio a esse associati; iii) effettuare un dose determination trial al fine di determinare il dosaggio terapeutico, la farmacocinetica, l'escrezione nel latte e l'efficacia antiparassitaria del mebendazolo in asini naturalmente infettati da strongili intestinali; iv) valutare attraverso il Faecal Egg Count Reduction test l'efficacia antiparassitaria e l'Egg Reappearance Period delle principali molecole antiparassitarie utilizzate in Italia (pyrantel pamoato, fenbendazolo, ivermectina e moxidectina) per il controllo delle elmintiasi nell'asino.

Nella stesura dell'elaborato finale è stata posta l'attenzione sia sulla descrizione delle razze asinine presenti in Italia sia sui principali utilizzi dell'asino nel nostro Paese.

È stata inoltre effettuata una disamina dei principali elminti intestinali nell'asino e una review sugli studi epidemiologici effettuati sui principali elminti nell'asino.

i) e ii) Tra il 2014 ed il 2016, 1.775 asini, allevati in 77 aziende dislocate sul territorio italiano, sono stati sottoposti ad esami copromicroscopici quali-quantitativi al fine di valutare la presenza di elminti intestinali nei singoli soggetti e quindi il quadro parassitologico aziendale attraverso la tecnica Special modification of McMaster method, Proudman Test e Sedimentazione in aqua fontis. Contestualmente agli allevatori/proprietari degli asini è stata eseguita una questionnaire survey, composta da domande a risposta aperta e domande a risposta multipla, al fine di valutare il management aziendale e nello specifico i trattamenti antiparassitari praticati e i fattori di rischio eventualmente associati alle parassitosi nella specie asinina. Nel corso di questo studio i parassiti identificati sono stati: strongili intestinali (1.507/1.775 – 84,9%) in 77/77 aziende (100%), Dictyocaulus arnfieldi (122/1.775 – 6,87%) in 19 aziende (24,7%), Oxyuris equi (103/1.775 – 5,80%) in 22 aziende (28,6%), Parascaris spp. (64/1.775 – 3,61%) in 24 aziende (31,2%), Anoplocephala spp. (18/1.775 – 1,01%) in 9 aziende (11,7%), Strongyloides westeri (5/1.775 – 0,28%) in 3 aziende (3,9%). Gli esami coproculturali hanno evidenziato la presenza di larve di terzo stadio appartenenti a Cyathostominae (100%), S. vulgaris (31%), Poteriostomum spp. (25%), Triodontophorus spp. (9%), S. edentatus (7%), S. equinus (5%).

Dalla questionnaire survey è emerso che la molecola maggiormente utilizzata per il controllo delle endoparassitosi è l'ivermectina (1.118/1.775 – 63%) seguita dai benzimidazolici (348/1.775 – 20%), pyrantel (332/1.775 – 19%), moxidectina (202/1.775 – 11%). In misura minore sono impiegate le associazioni lattoni macrociclici+praziquantel (85/1.775 – 5%) e fitoterapici (49/1.775 – 3%).

L'analisi dei fattori di rischio ha evidenziato che il genere, la presenza del pascolo e la condivisione del pascolo con i ruminanti, il BCS, l'età, la dimensione dell'azienda ed il numero dei trattamenti non sono fattori di rischio associati all'infezione da parte degli SI; mentre la razza, la condivisione del pascolo con i cavalli e l'origine geografica degli asini rappresentano fattori di rischio associati alla parassitosi sostenuta dagli strongili intestinali ($p<0,05$). Le infezioni sostenute da Parascaris spp. sono invece influenzate dal genere, dall'età, dal BCS, dall'origine geografica e dalla dimensione dell'azienda ($p<0,05$) mentre la razza, la

presenza del pascolo e la sua condivisione sia con i ruminati che i cavalli e il numero dei trattamenti antiparassitari effettuati nel corso dell'anno non rappresentano fattori di rischio associati a questa parassitosi.

iii) Il mebendazolo è un farmaco antelmintico registrato per il controllo delle endoparassitosi sia nell'asino sia nel cavallo. Lo scopo di questa prova è stato quello di effettuare un dose determination trial al fine di determinare il dosaggio terapeutico, la farmacocinetica, l'escrezione nel latte e l'efficacia antiparassitaria del mebendazolo in asini naturalmente infettati da strongili intestinali. Diciotto asine in lattazione sono state distribuite, in base alla Faecal Egg Count, in tre gruppi da 6 animali ciascuno. Un gruppo ha costituito il gruppo controllo non sottoposto a trattamento antiparassitario mentre gli animali appartenenti agli altri due gruppi sono stati sottoposti a trattamento antiparassitario utilizzando una formulazione di mebendazolo pasta somministrata per os rispettivamente al dosaggio raccomandato per il cavallo, 10 mg/kg peso vivo (MBZ 1) ed al doppio del dosaggio raccomandato per il cavallo, 20 mg/kg peso vivo (MBZ 2). I campioni di sangue e di latte sono stati prelevati prima del trattamento antiparassitario e dopo il trattamento antiparassitario fino a 120 ore ed analizzati attraverso cromatografia liquida ad alta prestazione (High Performance Liquid Chromatography). Analisi copromicroscopiche quali-quantitative sono state eseguite utilizzando lo Special modification of McMaster method, su ogni singolo animale, prima del trattamento antiparassitario (giorno -3) ed in seguito al trattamento, a cadenza settimanale, dal giorno 7 al giorno 56. Le concentrazioni plasmatiche e l'assorbimento sistemico del mebendazolo sono stati relativamente inferiori se confrontati con gli altri benzimidazolici metilcarbamati. Disposizioni plasmatiche dose-dipendenti sono state osservate all'aumentare del dosaggio utilizzato (10 mg/kg peso vivo vs 20 mg/kg peso vivo). Il mebendazolo somministrato al dosaggio di 10 mg/kg peso vivo non è stato rinvenuto in nessun campione di latte, mentre negli animali trattati al dosaggio di 20 mg/kg peso vivo ha raggiunto una concentrazione massima nel latte, dopo 10,66 ore dal trattamento antiparassitario pari a 0,01 g/ml e il valore di AUC latte/AUC plasma è stato di $0,18 \pm 0,02$. Questo studio ha dimostrato che il mebendazolo pasta somministrato per via orale nell'asino ha un grado di dispersione minimo nel latte e che può essere utilizzato negli asini in lattazione senza tempi di sospensione. Per entrambi i dosaggi (10 mg/kg peso vivo e 20 mg/kg peso vivo) i risultati ottenuti tramite il Faecal Egg Count Reduction Test hanno dimostrato un'efficacia > 95% sino a 28 giorni dal trattamento. I risultati

ottenuti indicano che il mebendazolo somministrato per via orale negli asini al dosaggio di 10 mg/kg si è dimostrato sicuro ed efficace nel controllo dei *Cyathostominae*, per cui può essere utilizzato al medesimo dosaggio sia nella specie equina sia in quella asinina.

iv) I trattamenti antiparassitari rappresentano la principale strategia di controllo delle parassitosi e l'utilizzo dei farmaci antielmintici ha effetti positivi sia sulla crescita sia sulle performances degli animali. Le principali molecole utilizzate nel controllo delle parassitosi intestinali, sia nell'asino che nel cavallo, sono rappresentate dalle tetraidropirimidine, dai benzimidazolici e dai lattoni macrociclici. L'utilizzo irrazionale di queste molecole disponibili in commercio ha comportato lo sviluppo dell'antielmintico resistenza da parte dei parassiti specialmente *Cyathostominae*. Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare, alla dose specifica per il cavallo, l'efficacia antiparassitaria dei quattro principi attivi (PYR, FBZ, IVM, MOX) comunemente utilizzati per il controllo delle strongilosi negli asini attraverso l'utilizzo del FECRT e dell'ERP così come riportato dalle linee guida proposte dalla AAEP in due aziende asinine "A" e "B". In ogni azienda, in base alla Faecal Egg Count, sono state selezionate 24 asine e suddivise in 4 gruppi di trattamento. Il primo gruppo è stato sottoposto a trattamento antiparassitario con Pyrantel pamoato pasta al dosaggio terapeutico utilizzato per i cavalli (6,94 mg/kg peso vivo), il secondo gruppo è stato sottoposto a trattamento antiparassitario con Fenbendazolo pasta al dosaggio terapeutico utilizzato per i cavalli (7,5 mg/kg peso vivo), il terzo gruppo è stato sottoposto a trattamento antiparassitario con Ivermectina pasta al dosaggio terapeutico utilizzato per i cavalli (200 mcg/kg peso vivo), il quarto gruppo è stato sottoposto a trattamento antiparassitario con Moxidectina gel orale al dosaggio terapeutico utilizzato per i cavalli (400 mcg/kg peso vivo).

Analisi copromicroscopiche quali-quantitative sono state eseguite utilizzando lo Special modification of McMaster method, su ogni singolo animale, prima del trattamento antiparassitario (giorno -2) ed in seguito al trattamento, a cadenza settimanale, sino a 12 settimane post trattamento.

Nell'azienda "A" la Faecal Egg Count, effettuata due settimane dal trattamento, ha evidenziato un'elevata efficacia per tutte le molecole: Pyrantel pamoato (99,3%), Fenbendazolo (99,8%), Ivermectina e Moxidectina (100%). I valori di ERP sono stati sia per il Pyrantel sia per

il Fenbendazolo >80% sino alla sesta settimana post trattamento; mentre ivermectina e moxidectina hanno presentato un valore di ERP>100% rispettivamente sino alla 12° ed 11° settimana post trattamento. In questa azienda prima dell trattamento antiparassitario sono stati rinvenute larve di terzo stadio appartenenti a Cyathostominae e S. vulgaris mentre in seguito al trattamento antiparassitario solo larve di terzo stadio appartenenti a Cyathostominae.

Nell'azienda "B" la Faecal Egg Count, effettuata due settimane dal trattamento, ha evidenziato un'elevata efficacia da parte di Ivermectina e Moxidectina (100%), tuttavia ha evidenziato una sospetta resistenza da parte del Pyrantel pamoato (86,3%) ed una resistenza da parte del Fenbendazolo (83,9%). I valori di ERP per Ivermectina e Moxidectina sono stati inferiori rispetto a quanto suggerito dalle linee guida della AAEP assumendo valori inferiori al 90% rispettivamente del 89,3% a 8 settimane e del 89,6% a 9 settimane. In questa azienda prima del trattamento antiparassitario sono stati rinvenute larve di terzo stadio appartenenti a Cyathostominae e S. vulgaris; successivamente al trattamento antiparassitario, per tutti i gruppi, sono state rinvenute esclusivamente larve di terzo stadio appartenenti a Cyathostominae.

Lo studio della valutazione della ERP, ha fornito evidenze di una iniziale riduzione dei valori di ERP dopo trattamento con ivermectina e moxidectina anche negli asini. Questo dato è in accordo con altri recenti report di ERP ridotti nei cavalli dopo trattamento con lattoni macrociclici.

Il genere *Equus* comprende da un punto di vista filogenetico otto specie ancora esistenti: due asini asiatici (*Equus kiang* e *Equus hemionus*), una specie di asino africano (*Equus asinus*), tre specie di zebra (*Equus burchelli*, *Equus grevi* ed *Equus zebra*) e due specie di cavalli (*Equus caballus* e *Equus przewalskii*) (Oakenfull e Clegg, 1988).

L'asino (*E. asinus*, $2n = 62$), *ass* o *burro* (i nomi comunemente utilizzati per indicare l'asino rispettivamente nei Paesi dell'emisfero occidentale e meridionale), pur essendo una specie completamente diversa dal cavallo (*E. caballus*, $2n = 64$), ha, con quest'ultimo, caratteristiche genetiche comuni tanto da poter produrre ibridi sterili come il mulo (ibrido derivante dall'incrocio tra un asino maschio ed un cavallo femmina) ed il bardotto (ibrido derivante dall'incrocio tra un cavallo maschio ed un asino femmina) (Lasley, 1978). Studi morfologici e molecolari hanno, inoltre, confermato la stretta associazione tra la zebra e l'asino (Oakenfull e Clegg, 1988).

I dati demografici relativi alla consistenza della popolazione equina mondiale sono riportati dalla FAO (*Food and Agriculture Organization*) ed attualmente è stimato che siano presenti sulla terra oltre 112 milioni di equidi (58,5 milioni di cavalli, 43 milioni di asini e 10,5 milioni di muli) (FAO, 2013). Il 98% degli asini, il 97% dei muli e il 60% dei cavalli sono allevati in paesi in via di sviluppo. Non ci sono informazioni precise sulla consistenza demografica delle zebre e degli altri equidi selvatici.

Gli asini sono stati tra i primi equidi ad essere addomesticati e, nonostante la ampia diffusione della meccanizzazione, la maggior parte di questi animali (oltre il 97%) è ancora oggi allevata per il trasporto di persone, cose e nelle attività agricole (Marshall, 2007; Pritchard, 2010; Bogale et al., 2012). Nei Paesi in via di sviluppo, l'utilità ed il ruolo sociale dell'asino sono testimoniati dall'ampia diffusione di questa specie animale sia nelle aree urbane che in quelle extraurbane (Getahun e Kassa, 2017); infatti, è stato dimostrato che gli asini e i muli svolgono un ruolo importante per il trasporto di cibo e altri prodotti da e verso i villaggi distanti dalle città (Pearson e Krecek, 2006). Diversamente, in molti Paesi industrializzati, gli asini sono allevati prevalentemente per attività ricreative, per lo sviluppo della razza o come animali da compagnia (Starkey e Starkey, 1996). Inoltre, in alcuni Paesi europei, come in Italia, gli asini sono allevati anche per la produzione di latte e di carne (Starkey e Starkey, 1996).

Rispetto al cavallo, l'asino è spesso descritto come una specie forte e resistente, il che induce a credere che sia un animale che non si ammali e

che non necessiti di particolari cure e trattamenti veterinari (Solomon et al., 2012; Wako et al., 2016). Tuttavia diversi studi hanno dimostrato come gli asini possano essere suscettibili agli stessi agenti patogeni che colpiscono gli altri equidi, che possono influenzare negativamente sia lo stato di salute che le performance produttive (Yoseph et al., 2005; Solomon et al., 2012). Tra le patologie che colpiscono l'asino quelle ad eziologia parassitaria sono le più diffuse ed incidono negativamente sullo stato di salute e sulla produttività di questi animali (Ali et al., 2001; Yoseph et al., 2005; López-Olvera et al., 2006; Getachew et al., 2010a; Hinney et al., 2011; Nuraddis et al., 2011; Zerihun et al., 2011; Solomon et al., 2012; Mezgebu et al., 2013; Sumbria et al., 2014, 2016; Nakayima et al., 2017).

Gli asini possono essere ospiti di numerosi elminti tra i principali si riportano nematodi a localizzazione gastrica come *Draschia megastoma*, *Habronema* spp., *Trichostrongylus axei*; *Strongyloides westeri* e *Parascaris* spp. che si localizzano nel piccolo intestino; *Cyathostomum* spp., *Cylicocyclus* spp., *Poteriostomum* spp., *Craterostomum* spp., *Oesophagodontus* spp., *Strongylus* spp., *Triodontophorus* spp., *Oxyuris equi*, *Probstmayria vivipara* che si localizzano nel grosso intestino; *Dictyocaulus arnfieldi* a localizzazione polmonare; *Thelazia lacrymalis* che si localizza a livello oculare; *Onchocerca reticulata*, *Parafilaria multipapillosa*, *Setaria equina*, che si ritrovano a livello del tessuto connettivo; *Trichinella* spp. che si localizza a livello muscolare), cestodi (*Anoplocephala* spp., *Paranoplocephala mamillana* che si localizzano nel piccolo intestino ed idatidi di *Echinococcus granulosus* a livello epatico e polmonare) e trematodi (*Gastrodiscus* spp. che si localizza nel grosso intestino; *Fasciola hepatica* e *Dicrocoelium dendriticum* che si ritrovano a livello epatico).

Questi parassiti, in relazione alla specie, al numero di esemplari presenti e a fattori intrinseci dell'ospite quali età, stato di nutrizione e risposta immunitaria, si rendono responsabili di danni più o meno gravi (Pereira e Vianna, 2006).

Studi condotti in diverse parti del mondo in allevamenti asinini, hanno dimostrato il coinvolgimento di differenti specie di elminti (Sotiraki et al., 1997; Wells et al., 1998; Yoseph et al., 2001; Matthee et al., 2002; Pereira e Vianna, 2006; Uslu e Guçlu, 2007; Getachew et al., 2010a; Morrow et al., 2011; Alemayehu e Etaferahu, 2013; Mezgebu et al., 2013; Getahun e Kassa, 2017); inoltre queste ricerche hanno evidenziato che nei Paesi in via di sviluppo, dove l'igiene ed il management degli animali sono spesso scadenti, le elmintosi risultano ampiamente diffuse e rappresentano uno dei

principali problemi sanitari (Zerihun et al., 2011; Getahun e Kassa, 2017). In letteratura è stato riportato che gli elminti possono provocare nella specie asinina scadenti condizioni generali, diarrea, coliche, emaciazione, disturbi di crescita, scarse performances riproduttive e predisposizione ad altre patologie ad eziologia batterica o virale (Elisabeth e Sevendesen, 1997; Svendsen 1997a,b; Love et al., 1999; Krecek e Guthire, 1999; Getachew, 1999; Fikru et al., 2005; Yoseph et al., 2005; Ayele et al., 2006, Getachew et al., 2010a,b); tuttavia questi segni clinici sono più frequenti ed apprezzabili nel cavallo rispetto agli asini, zebre ed altri equidi selvatici (Malan et al., 1997; Morrow et al., 2011; Matthews e Burden, 2013).

L'asino, inoltre, viene spesso gestito in maniera diversa rispetto al cavallo e può rappresentare un serbatoio clinicamente silente di malattie parassitarie ed infettive (Veneziano et al., 2013); proprio per questo motivo è necessario sviluppare programmi di controllo basati sull'uso appropriato dei farmaci antiparassitari.

In Italia le problematiche connesse alle infezioni da elminti negli asini sono sottovalutate e poco studiate (Veneziano et al., 2011).

In letteratura sono presenti esclusivamente dati relativi a piccole popolazioni di asini allevati in Sicilia (Giannetto et al., 2008), Emilia Romagna (Trentini et al., 2010) e Sardegna (Garippa et al. 2016).

Gli obiettivi di questo percorso di studio di Dottorato di ricerca in Scienze Veterinarie XXX ciclo sono stati:

- ✓ Effettuare una questionnaire survey sulle differenti pratiche di allevamento e management nelle aziende asinine in Italia con particolare attenzione alle pratiche di controllo antiparassitario e alle differenti molecole utilizzate;
- ✓ Effettuare uno studio epidemiologico a carattere nazionale nelle aziende asinine in Italia al fine di valutare il quadro parassitologico aziendale, con particolare riferimento alla presenza e diffusione delle principali elmintosi;
- ✓ Effettuare un *dose determination trial* per valutare il dosaggio, l'efficacia, la farmacocinetica e l'escrezione nel latte del mebendazolo in asini naturalmente infettati da Cyathostominae.
- ✓ Valutare l'efficacia antiparassitaria attraverso *Faecal Egg Count Reduction Test* (FECRT) delle principali classi farmacologiche utilizzate nel trattamento delle elmintiasi negli asini e il periodo di ricomparsa delle uova nelle feci (*Egg Reappearance Period – ERP*).

- Alemayehu, R. e Etaferahu, Y. (2013). Gastrointestinal parasites of Equine in South Wollo Zone, North Eastern Ethiopia. *Global Veterinaria*, 11(6): 824-830.
- Ali, T.M.O., Ibrahim, K.E.E., Eltom, E.H., Haimid, M.E. (2001). Animal diseases diagnosed at the University of Khartoum Veterinary Teaching Hospital (1995-1998). *Sudan Journal of Veterinary Science and Animal Husbandry*, 40: 38-44.
- Ayele, G., Feseha, G., Bojia, A., Joe, A. (2006). Prevalence of gastrointestinal parasites of donkeys in Dudga Bora District, Ethiopia. *Livestock Research for Rural Development*, 18: 2-6.
- Bogale, B., Sisay, Z., Chanie, M. (2012). Strongyle Nematode Infection of Donkeys and Mules in and Around Bahirdar, Northwest Ethiopia. *Global Veterinaria*, 9(4): 497-501.
- Elisabeth, D. & Sevendesen, M. (1997). Professional donkey hand book. Anley road, London W14 OBY, pp. 61-69.
- Fikru, R., Reta, D., Teshale, S., Bizunesh, M. (2005). Prevalence of equine gastrointestinal parasites in Western highlands of Oromia. *Bulletin of Animal Health and Production in Africa*, 3: 161-166.
- Food and Agricultural Organization FAO (2013). Food and Agriculture Organization Stat Database Available at <http://faostat.fao.org/faostat/form>.
- Garippa, G., Elisabetta, P., Sanna Passino, E., Pau, S., Columbano, N., Scanu, A., Caggiu, S., Deiana, R., Melosu, V., Manfredi, M.T. (2016). Risk factors of gastrointestinal parasites lungworms ticks and lice in donkeys in the Asinara National Park (Sardinia – Italy). *In: Abstract Book, LXX Convegno Sisvet*, pp. 258-259.
- Getachew, M.A. (1999). Epidemiological study on the health and welfare of Ethiopian donkeys, with particular reference to parasitic disease. *In: MVM thesis, University of Glasgow Veterinary School. Glasgow, Scotland, UK.*
- Getachew, M.A., Trawford, A., Feseha G., Reid, S.W.J. (2010a). Gastrointestinal parasites of working donkeys of Ethiopia. *Tropical Animal Health and Production*, 42: 27-33
- Getachew, M.A., Innocent, G.T., Trawford, A.F., Reid, S.W.J., Love, S. (2010b). Epidemiological features of fasciolosis in working donkeys in Ethiopia. *Veterinary Parasitology*, 169: 335-339.
- Getahun, T.K. e Kassa, T.Z. (2017). Prevalence and species of major gastrointestinal parasites of donkeys in Tenta Woreda, Amhara Regional State, Ethiopia. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health*, 9(2): 23-31.
- Giannetto S., Poglayen G., Brianti E. (2008). I parassiti dell'asina dall'immagine all'azione. *In: L'asino all'attenzione della comunità scientifica e del territorio. A cura di Conte F., Chiriotti Ed.* 32-36.
- Hinney, B., Wirtherle, N.C., Kyule, M., Miethe, N., Zessin, K., Clausen, P. (2011). Prevalence of helminths in horses in the state of Brandenburg, Germany. *Parasitology Research*, 108: 1083-1091.
- Krecek, R.C. e Guthrie, A.J. (1999). Alternative approaches to control cyathostomes: an African perspective. *Veterinary Parasitology*, 85: 151-162.
- Lasley, J.F. (1978). Genetics of livestock improvement. (3rd ed.). Prentice Hall, Inc., Englewood Cliffs, NJ.
- López-Olvera, J.R., Höfle, U., Vicente, J., Fernández-de-Mera, I.G., Gortázar, C. (2006). Effects of parasitic helminths and ivermectin treatment on clinical parameters in the European wild boar (*sus scrofa*). *Parasitology research*, 98: 582-587.

- Love, S., Murphy, D., Mellor, D. (1999). Pathogenicity of cyathostome infection. *Veterinary Parasitology*, 85: 113-122.
- Malan, F.S., Horak, I.G., De Vos, V., Van Wyk, J.A. (1997). Wildlife parasites: lessons for parasites control in livestock. *Veterinary Parasitology*, 71: 197-153.
- Marshall, D. (2007). African pastoral perspectives on domestication of the donkeys: a first synthesis. In: Denham, T.; Iriarte, J.; Vrydaghs, L. (eds). *Rethinking Agriculture: Archaeological and Ethnoarchaeological Perspectives*. Left Coast Press Walnut Creek, CA, pp. 371-407.
- Mathee, S., Krecek, R.C., Milne, S., Boshoff, M., Guthrie, A. (2002). Impact of management interventions on helminth levels and body and blood measurements in working donkeys in South Africa. *Journal of Veterinary Parasitology*, 107: 103-113.
- Matthews, J.B. e Burden, F. (2013). Common helminth infections of donkeys and their control in temperate regione. *Equine Veterinary Education*, 25(9): 461-467.
- Mezgebu, T., Tafess, K., Tamiru, F. (2013). Prevalence of gastrointestinal parasites of horses and donkeys in and around Gondar Town, Ethiopia. *Open Journal of Veterinary Medicine*, 3: 267-272.
- Morrow, L.D., Smith, K.C., Piercy, R.C., du Toit, N., Burden, F.A., Olmos, G., Gregory, N.G., Verheyen, K.L.P. (2011). Retrospective analysis of *post mortem* findings in 1,444 aged donkeys. *Journal of Comparative Pathology*, 144: 145-156.
- Nakayima, J., Kabasa, W., Aleper, D., Okidi, D. (2017). Prevalence of endo-parasites in donkeys and camels in Karamoja sub-region, North-eastern Uganda. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health*, 9(1): 11-15.
- Nuraddis, I., Tilahun, B., Benti, D., Tadele, T. (2011). Survey of prevalence of helminth parasites of donkeys in and Atund Hawassa Town, Southern Ethiopia. *Global Veterinaria*, 6(3): 223-227.
- Oakenfull, E.A. e Clegg, J.B. (1988). Phylogenetic relationships within the genus *Equus* and the evolution of α and θ globin genes. *Journal of Molecular Evolution*, 57: 772-783.
- Pearson, R. e Krecek, R. (2006). Delivery of health and husbandry improvements to working animals in Africa. *Journal Animal Health and Production*, 38: 93-101.
- Pereira, J.R. e Vianna, S.S.S. (2006). Gastrointestinal parasitic worms in equines in the Paraíba Valley, State of São Paulo, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 140: 289-295.
- Pritchard, J. (2010). Animal traction and transport in the 21st century: getting the priorities right. *Veterinary Journal*, 186: 271-274.
- Solomon, T., Bogale, B., Chanie, M., Melaku, A. (2012). Occurrence of lungworm infection in equines and their associated risk factors. *Gloval Veterinaria*, 8(1): 35-38.
- Sotiraki, S., Badouvas, A., Himonas, C. (1997). A survey on the prevalence of internal parasites of equines in Macedonia and Thessalia-Greece. *Journal of Equine Veterinary Science*, 17: 550-552.
- Starkey, P. e Starkey, M. (1996). Regional and world trends in donkey populations. In: Starkey P. and Fielding D. (eds), *Donkeys, people and development. A resource book of the Animal Traction Network for Eastern and Southern Africa (ATNESA)*. ACP-EU Technical Centre for Agricultural and Rural Cooperation (CTA). Wageningen, The Netherlands. 244p. ISBN 92-9081-219-2.
- Sumbria, D., Singla, L.D., Sharma, A., Moudgil, A.D., Bal, M.S. (2014). Equine trypanosomosis in central and western Punjab: Prevalence, haematobiochemical response and associated risk factors. *Acta Tropica*, 138: 44-50.

- Sumbria, D., Singla, L.D., Sharma, A. (2016). *Theileria equi* and *Babesia caballi* infection of equids in Punjab, India: a serological and molecular survey. *Tropical Animal Health and Production*, 48: 45-52.
- Svendsen, E.D. (1997a). Parasites abroad. In: E.D. Svendsen (ed). The professional Handbook of The Donkey (3rd ed.). Whittet Books Limited. London, UK. pp. 227-238.
- Svendsen, E.D. (1997b). Donkeys abroad. In: E.D. Svendsen (ed). The professional Handbook of The Donkey (3rd ed.). Whittet Books Limited. London, UK. pp. 166-182.
- Trentini A., Stancampiano L., Usai F., Micagni G., Poglayen G. (2010). Donkey endoparasites in an organic farm. *Parassitologia*, 52: 336.
- Uslu, U. e Guçlu, F. (2007). Prevalence of endoparasites in horses and donkeys in Turkey. *Bulletin of the Veterinary Journal Institute in Pulawy*, 51: 237-240.
- Veneziano, V., Di Loria, A., Masucci, R., Di Palo, R., Brianti, E., Gokbulut, C. (2011). Efficacy of eprinomectin pour-on against *Dictyocaulus arnfieldi* infection in donkeys (*Equus asinus*). *Veterinary Journal*, 190(3): 414-415.
- Veneziano, V., Galietti, A., Mariani, U., Di Loria, A., Piantedosi, D., Neola, B., Guccione, J., Gokbulut, C. (2013). Field efficacy of eprinomectin against the sucking louse *Haematopinus asini* on naturally infested donkeys. *Veterinary Journal*, 197(2): 512-514.
- Wako, G., Buro, B., Mohammed, J., Ousman, A., Ebrahim, K., Hasen, M., Abdurahaman, M. (2016). Prevalence of major gastrointestinal parasites in donkeys in Dodola District, West Arsi, Oromia Regional State, Ethiopia. *World Journal of Agricultural Sciences*, 12(2): 119-124.
- Wells, D., Krecek, R., Wells, M., Guthrie, A., Lourens, J. (1998). Helminth levels of working donkeys kept under different management systems in the Moretele 1 district of the North-West Province, South Africa. *Journal of Veterinary Parasitology*, 77: 163-177.
- Yoseph, S., Feseha, G., Abebe, W. (2001). Survey on helminthiasis of equines in Wonchi, Ethiopia. *Journal of the Ethiopian Veterinary Association*, 5: 47-61.
- Yoseph, S., Smith, D.G., Mengistu, A., Teklu, F., Firew, T., Betere, Y. (2005). Seasonal variation in the parasite burden and body condition of working donkeys in East Shewa and West Shewa regions of Ethiopia. *Tropical Animal Health Production*, 37: 35-45.
- Zerihun, A., Bersissa, K., Bojia, E., Ayele, G., Tesfaye, M., Etana, D. (2011). Endoparasites of donkeys in Sululta and Gefersa Districts of Central Oromia, Ethiopia. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 10(14): 1850-1854.

Capitolo 1

L'Asino in Italia
Razze, produzioni ed utilizzo

1.1 Cenni sull'addomesticamento dell'Asino

Il periodo esatto di quando il cavallo e l'asino siano stati addomesticati non è ben chiaro ed alcuni studi recenti hanno dimostrato alcune pratiche di addomesticamento risalenti a circa 5000 anni fa (Jansen et al., 2002). Tuttavia, considerando che le prime testimonianze della presenza degli asini sono state dimostrate in Egitto, gli archeologi hanno ipotizzato che la domesticazione dell'asino sia avvenuta circa 6000 anni fa, prima del cavallo, nel nord dell'Africa con l'asino Nubiano e Somalo (*E. asinus africanus* ed *E. asinus somaliensis*) da parte delle popolazioni native della valle del Nilo (Beja-Pereira et al., 2004; Rossel et al., 2008; Kimura et al., 2011). Recenti scavi archeologici eseguiti nelle località di Maadi e El Omari ed il ritrovamento di 10 asini seppelliti nel complesso mortuario ad Abydos, durante il regno di Horus-Aha, il secondo imperatore della prima dinastia (3000 a.C.) (figura 1.1) hanno evidenziato la presenza degli asini nell'antico Egitto (Boessneck et al., 1992; von den Driesch, 1997; Rossell et al., 2008; Shackelford et al., 2013).



Fig. 1.1 Asini nel complesso mortuario di Abydos (Foto da Rossel et al., 2008)

Gli Egizi, sin dalla V dinastia (2500 a.C.), raffiguravano asini e probabilmente anche bardotti come si evince dal graffito di Levanzo (figura 1.2) o nel bassorilievo di Mastaba Asketep (figura 1.3) (Baroncini, 2001).

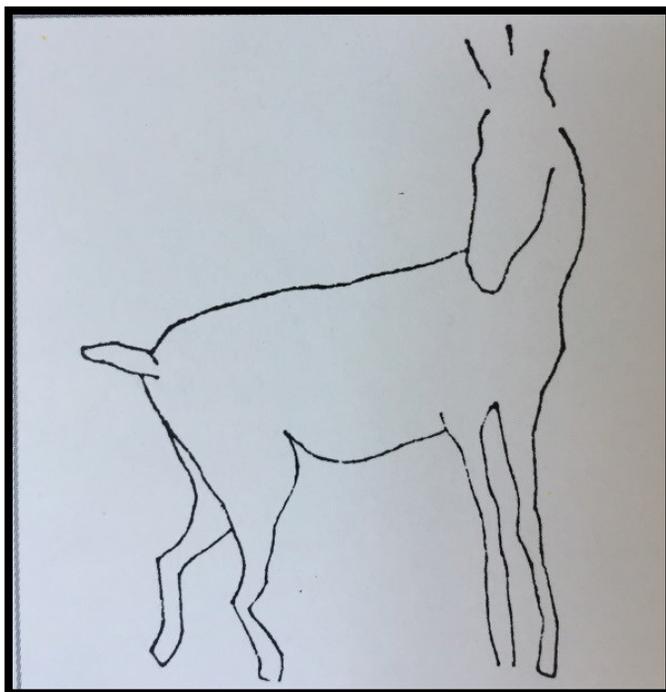


Fig. 1.2 Età della pietra. Piccolo asino selvatico. Graffito di Levanzo (da Baroncini, 2001).



Fig. 1.3 Mastaba di Asketep. Bassorilievo egizio su calcare del 2500 a.C. Asini di tipo nubiano addomesticato per impieghi agricoli (da Baroncini, 2001).

In Asia nel terzo millennio a.C. gli asini venivano addomesticati per essere cavalcati oppure attaccati ai carri e utilizzati come animali per arare con il basto. Negli anni '80, inoltre, sono stati ritrovati resti di carcasse di asini, datate circa 2800-2500 a.C., nel sud-ovest asiatico e precisamente in Siria, Iran e Iraq (Boessneck e von den Driesch, 1986; Zeder, 1986; Vila, 2006). Sin da quando è iniziato l'allevamento del cavallo (*E. caballus*) e dell'asino (*E. asinus*), circa 5000 anni fa (Allen e Short, 1997; Short, 1997), questi sono stati incrociati producendo due ibridi sterili ($2n = 63$): i muli (asino x cavalla) e bardotti (cavallo x asina). Muli e bardotti sono molto simili tra loro e risulta difficile distinguerli morfologicamente; tuttavia la distinzione fra questi due ibridi risulta essere fondamentale per gli allevatori e le associazioni che devono eseguire genotipizzazioni ufficiali (Franco et al., 2016).

1.2 Consistenza della popolazione asinina in Italia

In Italia, il numero di asini allevati ha subito una progressiva diminuzione da circa 500.000 esemplari degli anni '60 ai 23.000 soggetti presenti durante gli anni 2000 (FAO STAT, 2012). Nell'ultimo decennio però, vi è stata una inversione di tendenza e la popolazione asinina in Italia è più che raddoppiata con 53.500 capi censiti (dati AIA, 2012). La popolazione di asini è ancora in aumento, infatti ad oggi (dati AIA, ottobre 2017) il numero degli equidi in Italia è di circa 436.553 e comprende 80.421 asini, 348.998 cavalli, 189 bardotti, 6.822 muli, 111 zebre, 7 zebralli e 5 zebrasini.

Nel grafico seguente è schematizzato l'andamento demografico della popolazione asinina dagli anni '60 ad oggi (grafico 1.1).

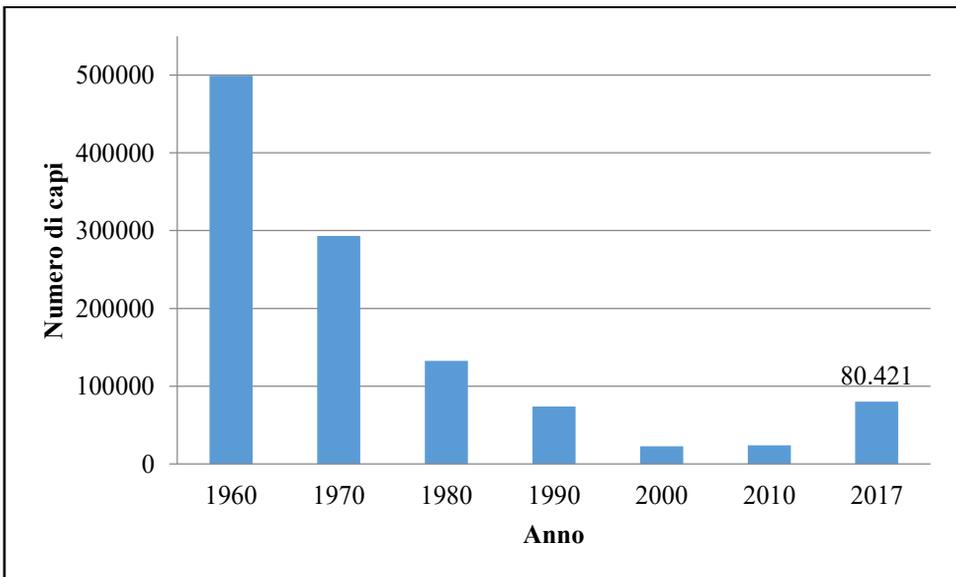


Grafico 1.1 Popolazione asinina in Italia dagli anni '60 ad oggi (ISTAT ed AIA)

L'Italia ha sempre avuto una tradizione di allevamento dell'asino, confermata dalle numerose razze autoctone. Ad oggi, gli asini allevati in Italia si suddividono in nove razze principali (Colli et al., 2013): Ragusano, Amiantino, Martina Franca, Sardo, dell'Asinara, Grigio Siciliano, Pantesco, Romagnolo e Grigio Viterbese.

La consistenza dei libri genealogici delle principali razze è indicata nella tabella sottostante (tabella 1.1) (dati AIA, 2017).

Tab. 1.1 Consistenza delle popolazioni delle principali razze asinine italiane

Razza asinina	Numero capi
Asino Ragusano	3.110
Asino Amiata	2.287
Asino Sardo	2.011
Asino Martina Franca	1.205
Asino Romagnolo	763
Asino dell'Asinara	261
Asino Viterbese	217
Asino Pantesco	77
Asino Grigio Siciliano	100*

www.anagrafeequidi.it/tabstatistiche

*Bigi e Zanon, 2008

Si evince come la maggior parte degli asini in Italia non risulta iscritta ai libri genealogici essendo spesso animali meticcii.

L'incremento della popolazione asinina nel nostro Paese è principalmente correlato alla domanda di latte ed, in alcune regioni, di carne, ma questi animali sono anche utilizzati per scopi ludici come il trekking someggiato. Altri utilizzi sono la terapia assistita con gli animali (onoterapia) e spesso l'asino è allevato come animale da compagnia (Karatosidi et al., 2013).

In Italia, nel mese di giugno del 2006, è stato istituito il Consorzio Nazionale degli allevatori di asini (National Consortium of Donkeys Breeders), con i seguenti obiettivi:

1. Direzione, coordinazione, supervisione e supporto di tutte le nuove attività del consorzio stesso (es. pet-terapy, onoturismo);
2. Promozione e protezione del latte di asino;
3. Promozione del sistema di allevamento e delle razze asinine, mantenimento della biodiversità e rispetto del benessere animale;
4. Monitoraggio della catena produttiva; i prodotti di origine animale devono essere caratterizzati dall'autenticità, dalla tracciabilità e dalla sicurezza alimentare. Il consorzio ha il compito di promuovere e sostenere la qualità dei prodotti nel rispetto della salute del consumatore, supportando la ricerca scientifica e la tecnologia;
5. Organizzare le attività che supportano e promuovono lo sviluppo rurale che dev'essere in grado di soddisfare le nuove richieste di mercato.

1.3 Principali razze asinine in Italia

1.3.1 Asino Ragusano

L'asino Ragusano è una razza asinina allevata in Sicilia, ed è associata ai comuni di Modica, Santa Croce Camerina e Scicli, tutti in provincia di Ragusa. È una delle razze più recenti, infatti, è stata identificata solo nel 1953, quando in seguito ad interventi di selezione, caratterizzati dall'incrocio tra l'asino di Pantelleria ed il Grigio Siciliano, l'Istituto di Incremento Ippico di Catania riuscì a fissare alcune caratteristiche tipiche (Bigi e Zanon, 2008). Questa razza è caratterizzata da un mantello baio scuro con ventre di biscia (grigio chiaro) esteso anteriormente e posteriormente alle facce interne degli arti fino ai due terzi dell'avambraccio e della coscia; focatura agli occhi; muso biancastro ben delimitato fin sopra alle narici con sfumature sfocate; criniera e coda nere (figura 1.4).



Fig. 1.4 Asino Ragusano e la sua distribuzione in Italia (Foto F. Buono)

L'asino Ragusano differisce dalle altre razze asinine allevate in Sicilia per la taglia, per la sua forte intelaiatura scheletrica e per la nevrilità.

Sebbene abituato ad un clima mediterraneo, questo asino si adatta bene ai climi rigidi e in passato è stato esportato nei Paesi del Nord Europa.

Di seguito (tabella 1.2) sono riportati i dati biometrici di questa razza asinina (Bigi e Zanon, 2008).

Tab. 1.2 Dati Biometrici dell'asino Ragusano

	Maschi	Femmine
Altezza al garrese (cm)	138	130
Circonferenza toracica (cm)	150	142
Circonferenza stinco	18	17

Questa razza veniva utilizzata principalmente per la produzione di muli, impiegati con successo per scopi militari. Negli ultimi anni, l'asino Ragusano ha avuto un sempre maggior utilizzo per la produzione del latte. Trova inoltre impiego per il trekking e la sella per equiturismo.

1.3.2 Asino Amiatino

L'Amiatino o asino dell'Amiata è una razza proveniente dalla regione Toscana, associata al monte Amiata nelle provincie di Siena e Grosseto, dove già alla fine dell'Ottocento era descritta una popolazione di asini con caratteristiche morfologiche omogenee caratterizzata da un mantello grigio con croce scapolare (Bigi e Zanon, 2008). Questa razza è allevata anche in altre provincie toscane quali Arezzo, Firenze, Livorno, Pisa e Pistoia. Popolazioni di asini amiatini sono presenti anche in Liguria ed in Campania (Bigi e Zanon, 2008).

È una razza di media grandezza e raramente supera i 140 cm al garrese. Il mantello è di color grigio ed è caratterizzato per la presenza di una croce scapolare e tipiche zebraure a livello degli arti (figura. 1.5). La zebraura è una caratteristica dell'asino somalo (*Equus asinus somaliensis*), mentre la croce è tipica dell'asino selvatico della Nubia (*Equus asinus africanus*).



Fig. 1.5 Asino Amiatino e la sua distribuzione in Italia (Foto F. Buono)

Questa razza ha rischiato l'estinzione nel secondo dopoguerra, ed è stato grazie all'intervento della regione Toscana in associazione con l'Istituto di Incremento Ippico di Pisa, che negli ultimi anni si è avuto un aumento

della sua consistenza. Il recupero dell'Amiatino è stato inoltre agevolato dall'intervento di alcuni allevatori che nel 1993 hanno fondato a Grosseto l'Associazione Micci Amiatini.

Di seguito (tabella 1.3) sono riportati i dati biometrici di questa razza asinina.

Tab. 1.3 Dati Biometrici dell'asino Amiatino

	Maschi	Femmine
Altezza al garrese (cm)	123-147	119-142
Circonferenza toracica (cm)	143-173	133-163
Circonferenza stinco	16-22	15-19

L'Amiatino veniva utilizzato principalmente per la soma, il tiro leggero e la cavalcatura. Ad oggi, grazie alle sua versatilità, alla docilità e alla buona indole è utilizzato nel trekking someggiato, nella pet-therapy e nell'ippoterapia.

1.3.3 Asino Sardo

L'asino Sardo è allevato principalmente in Sardegna. Le sue origini sono incerte ma molto antiche, probabilmente era presente in Sardegna già nel Neolitico, anche se alcuni autori fanno risalire la sua introduzione con i Fenici. Secondo altri studi furono i sardo-punici ad incrementarne l'allevamento per attività agricole e di trasporto. In base alle differenti zone di localizzazione a questa razza asinina sono state attribuite differenti denominazioni: *burriku* nelle regioni meridionali, probabilmente di origine spagnola; *poleddu* e *ainu* utilizzati rispettivamente in Barbagia e Goceano; ma *molente* (animale che lavora alla mola) è l'appellativo maggiormente diffuso nell'isola dovuto alla sua attività di macinatura. Infatti, questa razza asinina veniva utilizzata nelle aziende in differenti lavori quali la macinatura dei cereali, il trasporto della legna e dell'acqua ma anche per l'aratura. Il mantello è sorcino ed è caratterizzato da una croce scapolare ben marcata; le orecchie sono caratterizzate da un bordo scuro; possono essere presenti delle zebraure agli arti; il ventre è chiaro. La criniera generalmente è ridotta, caratterizzata da un colore più scuro rispetto al mantello, la coda è lunga con crini scarsi (figura 1.6).

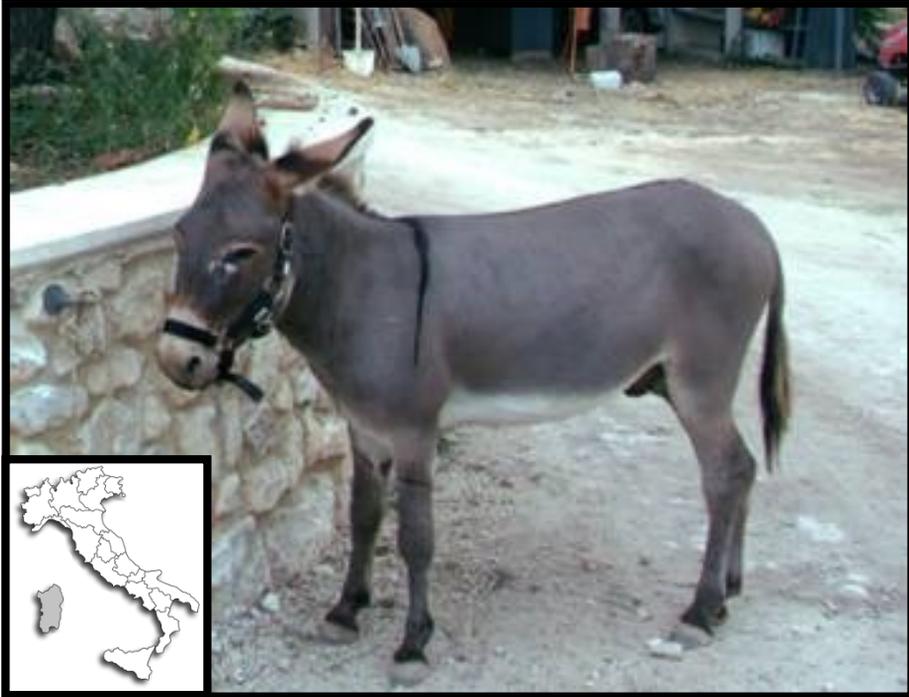


Fig. 1.6 Asino Sardo e la sua distribuzione in Italia (Foto da www.ciucolandia.it)

Di seguito (tabella 1.4) sono riportati i dati biometrici di questa razza asinina.

Tab. 1.4 Dati Biometrici dell'asino Sardo

	Maschi	Femmine
Altezza al garrese (cm)	80-110	80-110
Circonferenza toracica (cm)	137	137
Circonferenza stinco	15-18	15-18

Oggi l'allevamento è legato principalmente alla tradizione piuttosto che per finalità economiche; in Sardegna, tuttavia, viene anche utilizzato per il trekking someggiato e per il trasporto in aree rurali del vettovagliamento e delle attrezzature. Grazie alla sua attività di pascolamento svolge un ruolo importante nel mantenimento e salvaguardia del territorio; inoltre, essendo in grado di sfruttare nel migliore dei modi i pascoli poveri ed il sottobosco, svolge un importante ruolo nella prevenzione degli incendi.

1.3.4 Asino di Martina Franca

L'Asino di Martina Franca è una razza asinina allevata nella regione Puglia, principalmente associata alla municipalità di Martina Franca, da cui prende il nome; tuttavia è allevata anche in altre località quali Alberobello, Locorotondo, Noci (provincia di Bari), Ceglie Messapica (provincia di Brindisi), Massafra e Mottola (provincia di Taranto). Sebbene non si abbiano notizie precise, alcune tradizioni farebbero risalire questa razza asinina all'asino catalano, importato nella Murgia dai Conti di Conversano all'epoca della dominazione spagnola. Montanaro (1930) riferisce che l'importazione di asini spagnoli sarebbe stata unica e relativa a solo 15 soggetti. Di certo è che due stalloni di razza catalana furono importati dalla Spagna dal Ministero dell'Agricoltura e Foreste nei primi anni Settanta e assegnati all'Istituto di Incremento Ippico di Foggia.

Popolazioni di questa razza asinina, inoltre, sono presenti anche in Abruzzo, Lazio, Lombardia e Umbria (Bigi e Zanon, 2008). Questo asino è famoso per le sue qualità come stallone nella produzione dei muli, specialmente quando incrociato con cavalli Murgesi per la produzione del "mulo-martinese", anche chiamato "mulo di Martina Franca". Nel 1925, circa il 70% dei muli italiani, veniva allevato in Puglia per poi essere esportato in Francia, Germania, ex Jugoslavia ed America del Nord (Bigi e Zanon, 2008). Nel 1948 fu istituita l'Associazione Regionale degli Allevatori dell'Asino di Martina Franca e del Cavallo delle Murge al fine di sviluppare l'allevamento e la commercializzazione di queste razze.

Nel 2008, il numero totale asini di Martina Franca era di circa 400 soggetti (Bigi e Zanon, 2008) e nel 2007, la FAO, ha inserito l'asino di Martina Franca tra le razze in via di estinzione (Rischkowsky, 2007).

L'asino di Martina Franca è di tipo mesomorfo e, nel complesso, mostra uno sviluppo armonico delle forme, caratterizzato da eccezionale robustezza, buona nevrilità, temperamento piuttosto vivace; inoltre, grazie alla sua frugalità si adatta molto bene ai terreni marginali e pietrosi. Il mantello di questa razza è caratterizzato da un pelo baio scuro, con muso, regione sternale, addome ed interno cosce di colore grigio scuro; le cavità orbitali e la parte superiore del muso possono riportare una striscia di colore rossastro (Gandini e Rognoni, 1997) (figura 1.7).



Fig. 1.7 Asino di Martina Franca e la sua distribuzione in Italia
(Foto da www.agraria.org)

Di seguito (tabella 1.5) sono riportati i dati biometrici di questa razza asinina.

Tab. 1.5 Dati biometrici dell'Asino di Martina Franca

	Maschi	Femmine
Altezza al garrese (cm)	135	127
Circonferenza toracica (cm)	145	140
Circonferenza stinco	19	17

Ad oggi l'asino di Martina Franca è ancora utilizzato, in alcune zone montane appenniniche ed alpine per la produzione dei muli; tuttavia trova il principale impiego nella produzione del latte di asina per uso pediatrico e per l'industria cosmetica e, per la produzione di carne di asino sia per il consumo fresco sia per gli insaccati. Inoltre è utilizzato per il trekking someggiato e per l'onoterapia.

1.3.5 Asino Romagnolo

L'asino Romagnolo è allevato in Emilia Romagna, principalmente nelle provincie di Forlì, Bologna, Ravenna e Reggio Emilia (Bigi e Zanon, 2008). In passato questa razza veniva considerata una sottorazza dell'asino Pugliese, infatti, nel 1925, le razze asinine italiane erano considerate essere quattro: Pugliese, Siciliana, Sarda e Pantesco. La Pugliese, a sua volta, era costituita da cinque sottorazze: della Calabria, della Basilicata, Leccese o di Martina Franca, Marchigiana e Romagnolo.

Nel corso della seconda guerra mondiale, l'esercito tedesco, quando si era opposto alla risalita degli alleati verso il nord e successivamente allo sfondamento della Linea Gotica, aveva raziato e decimato questa razza asinina, così come aveva fatto anche per le vacche ed i cavalli, vuoi per cibarsene, vuoi per trainare quanto era possibile nelle retrovie del fronte. Proprio per questo motivo, a pochi mesi dalla fine del conflitto bellico, il Ministero dell'Agricoltura, con una Delibera del 1945, dichiarò questa razza estinta. Tuttavia, l'asino Romagnolo, seppure in misura ridotta riuscì a sopravvivere, infatti, la collocazione di questi asini in podéri inaccessibili sui crinali di collina, specialmente quella forlivese, e la secolare tradizione familiare, costituirono una sorta di "nicchia biologica inespugnabile". Tra il 2002 ed il 2003 la regione Emilia Romagna in collaborazione con le APA (Associazioni Provinciali Allevatori) decisero di censire questa razza asinina e contarono solamente 76 capi. Nel 2006 l'asino Romagnolo fu nuovamente riconosciuto come razza autoctona. Probabilmente questa razza ha avuto un ruolo chiave nella formazione della razza Amiatina.

È caratterizzato da un mantello sorcino e da una riga mulina con croce scapolare lunga e ben marcata, zebratura agli arti anteriori assente ai posteriori (figura 1.8). Sono ammessi anche altri mantelli quali il baio, il morello ed il sauro.

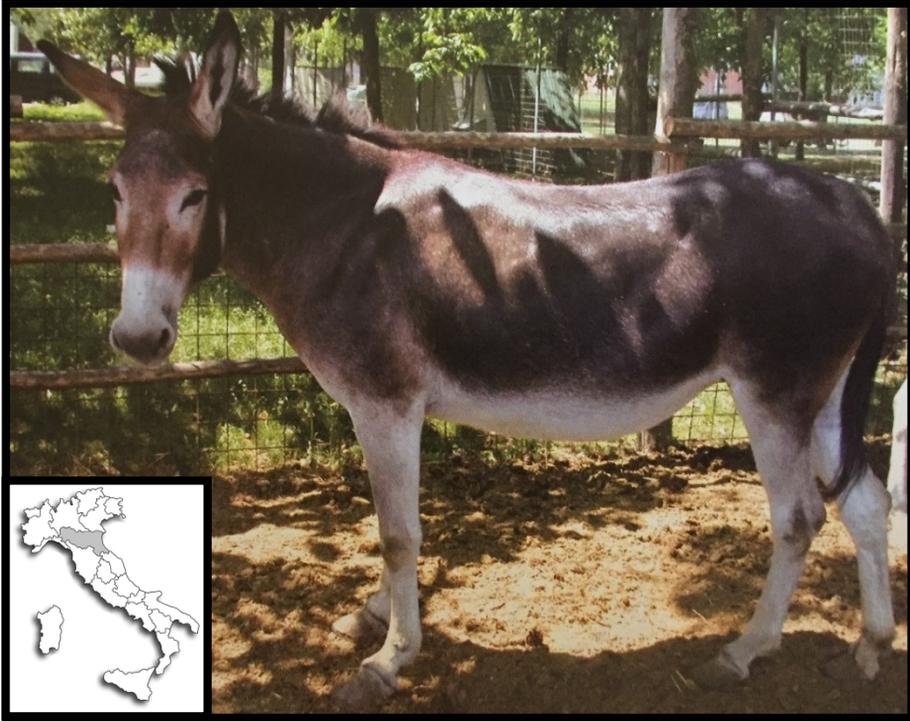


Fig. 1.8 Asino Romagnolo e la sua distribuzione in Italia (Foto da Bigi e Zanon)

Di seguito (tabella 1.6) sono riportati i dati biometrici di questa razza asinina.

Tab. 1.6. Dati biometrici dell'asino Romagnolo

	Maschi	Femmine
Altezza al garrese (cm)	135-155	130-145
Circonferenza toracica (cm)	150	140
Circonferenza stinco	18	17

Nella prima metà del secolo scorso veniva utilizzato per i trasporti a soma o per il traino leggero, ad oggi questo asino è mantenuto da pochi pastori transumanti nella zona appenninica dell'Emilia Romagna. Utilizzato in passato anche per la produzione mulina, oggi trova maggiormente impiego nella produzione del latte d'asino e nell'onoterapia.

1.3.6 Asino dell'Asinara

L'asino dell'Asinara è una razza selvatica originaria dell'omonima isola che si erge a Nord-Est della costa della Sardegna, in provincia di Sassari. Quest'isola era abitata sino al 1885, per poi divenire penitenziario e un sito di quarantena animale, e poi essere riaperta al pubblico nel 1999 in seguito alla costituzione del Parco nazionale dell'Asinara.

L'origine di questi asini non è ben nota e si basa solo su alcune ipotesi e leggende: sembrerebbe che questo asino fosse originario dell'Etiopia (*Equus aetiopicus*) e che fu introdotto in Sardegna nel terzo millennio a.C. con lo sviluppo del commercio marittimo; un'altra ipotesi sostiene che fu il Marchese di Mores, nell'800, che importò dall'Egitto questa razza asinina. Sebbene quest'ultima sia la tesi più probabile sulle origini dell'asino dell'Asinara, un'altra ipotesi racconta il naufragio di un vascello proveniente dall'Egitto e diretto verso la Francia, carico di asini che sarebbero stati dispersi sull'isola dell'Asinara alla fine del 1700. Alcune testimonianze orali, invece, raccontano della presenza di asini bianchi sull'isola sin dalla fine dell'ottocento, probabilmente abbandonati dagli asinaresi quando si trasferirono a Stintino nel 1885 in seguito alla trasformazione dell'isola a demanio dello Stato.

Attualmente gli asini sull'isola vivono allo stato brado in piccoli gruppi di tre/quattro femmine, con un rapporto maschi/femmine di 0,7.

Durante il censimento effettuato nel 1989 è stato osservato che gli asini presenti sull'isola erano suddivisi in due grandi gruppi: un primo gruppo nella zona di Traboccatu costituito da 40 soggetti (17 maschi e 23 femmine) ed un secondo gruppo presente nella zona di Santa Maria costituito da 16 capi (6 maschi e 10 femmine) (Vincenti, 2007).

La maggior parte di questi asini presenta mantello completamente bianco con cute rosa (albin), muso roseo ed occhi rosa-celesti; tuttavia è presente un piccolo numero di animali dal mantello di colore grigio, probabilmente portatori eterozigoti del gene albino (Bigi e Zanon, 2008) (figura 1.9).



Fig. 1.9 Asino dell'Asinara e la sua distribuzione in Italia (Foto da www.asiniasinara.it)

Di seguito (tabella 1.7) sono riportati i dati biometrici di questa razza asinina.

Tab. 1.7 Dati biometrici dell'asino dell'Asinara

	Maschi	Femmine
Altezza al garrese (cm)	80-105	80-105
Circonferenza toracica (cm)	100	100
Circonferenza stinco	11-13	11-13

L'asino dell'Asinara rappresenta un patrimonio faunistico di importanza scientifico-culturale, considerando che l'omonima isola è dal 2002 Parco Nazionale. Grazie all'attività pascolativa nel sottobosco questi animali svolgono un ruolo importante nella prevenzione degli incendi.

1.3.7 Asino Viterbese

L'asino viterbese (o di Allumiere) è originario della zona dei Monti della Tolfa (regione Lazio), dove viene utilizzato per l'onoterapia, l'equiturismo e la produzione lattea; inoltre è impiegato nel comune di Allumiere anche per il tradizionale Palio delle Contrade, manifestazione equestre che risale ai primi anni del XVI secolo, quando il senese Agostino Chigi, al tempo appaltatore delle miniere di allume, dalle quali Allumiere trae il nome e le sue origini, volle riprodurre il folklore tipico di Siena, organizzando delle corse con gli asini nel piazzale antistante lo stabilimento.

L'asino di Allumiere presenta una taglia medio-grande ed ha la caratteristica peculiare di cambiare con l'età il colore del mantello; infatti alla nascita il colore del mantello varia dal baio chiaro al baio scuro, mentre dopo i 30 mesi, il pelo cambia colore e tende invece a divenire grigio brunastro, grigio pomellato, fino a grigio molto chiaro negli asini più anziani. La riga mulina crociata è presente solo sporadicamente, mentre gli arti, il muso e l'addome sono di un colore grigio più chiaro (figura 1.10).

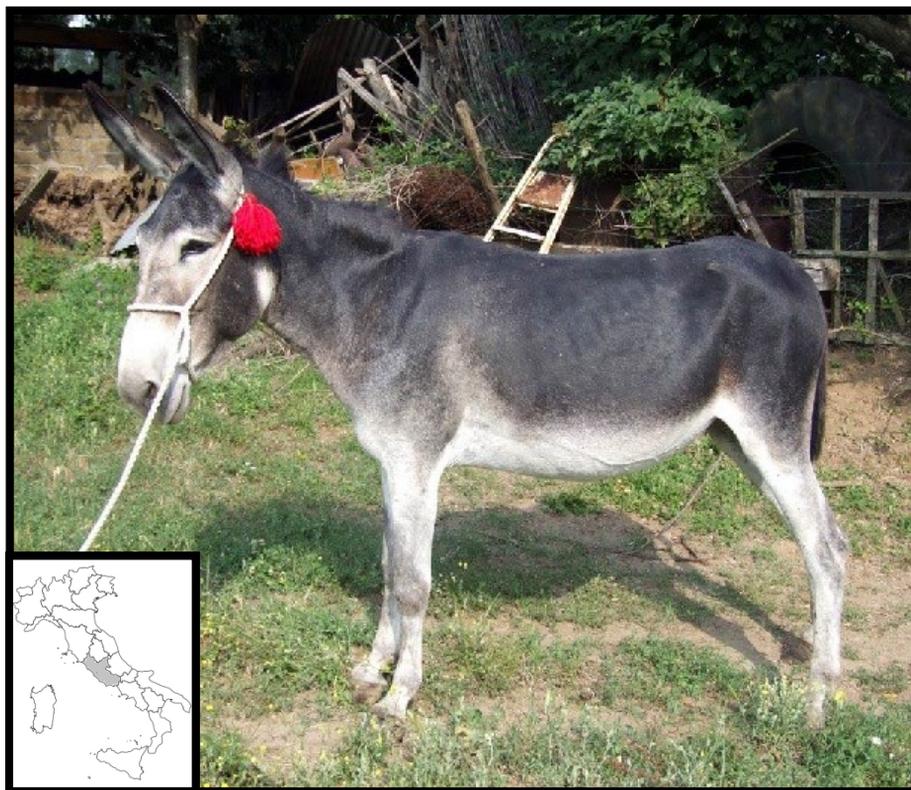


Fig. 1.10 Asino Viterbese e la sua distribuzione in Italia (Foto da www.agraria.org)

Di seguito (tabella 1.8) sono riportati i dati biometrici di questa razza asinina.

Tab. 1.8 Dati biometrici dell'asino Viterbese

	Maschi	Femmine
Altezza al garrese (cm)	119-137	112-135
Circonferenza toracica (cm)	100	100
Circonferenza stinco	11-13	11-13

1.3.8 Asino Pantesco

L'asino Pantesco o anche di Pantelleria è una razza asinina allevata nell'isola di Pantelleria nel bacino del mar Mediterraneo, nel Sud-Ovest della Sicilia dove fu introdotta durante il dominio saraceno (Di Rosa et al., 2007) ed utilizzata principalmente come mezzo di trasporto. In passato questo asino rappresentava una importante risorsa zootecnica, infatti, i suoi ibridi (muli) erano apprezzati non solo in Italia ma anche all'estero. Spesso veniva utilizzato anche durante gare di velocità su pista e veniva, inoltre, preferito al cavallo grazie alla sua cavalcatura più comoda e rapida sui vari tipi di terreno (figura 1.11); poichè essendo uno straordinario ambiatore, durante il lavoro ordinario, poteva raggiungere anche i 15 km/h. Ci sono stati periodi in cui sull'isola venivano organizzate gare di velocità su pista che registravano tempi molto bassi, come i record di 25 km/h su un percorso in piano di alcuni chilometri.

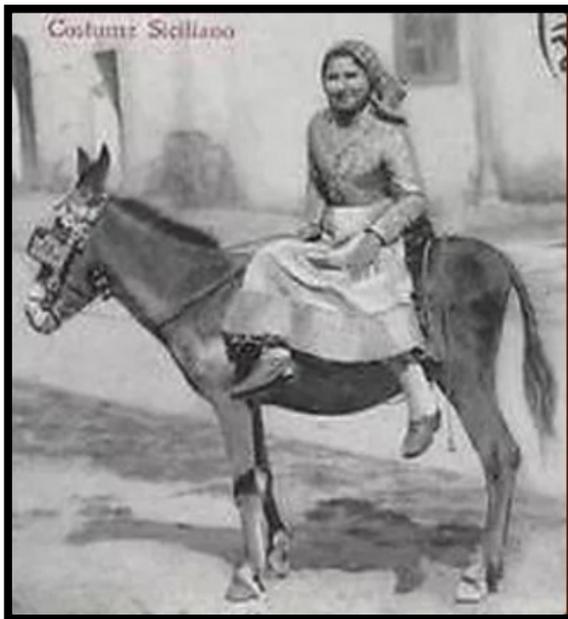


Fig. 1.11 Cartolina con contadina siciliana che monta in modalità "antica amazzone" su un asino Pantesco (Foto da www.asinofelice.com/asinopantesco)

L'asino Pantesco è un asino di tipo dolicomorfo dal mantello di un tipico colore baio scuro; il muso è quasi bianco, l'addome e la faccia interna delle

cosce sono caratterizzati da una colorazione biancastra e scarsi crini sulla coda (c.d. ventre di biscia) (figura 1.12).

Nel corso della seconda guerra mondiale, l'isola di Pantelleria rappresentava un sito strategico di guerra nel Mediterraneo e dei pochi asini presenti sull'isola si persero le tracce (Di Rosa et al., 2007). L'ultimo stallone pantesco di razza pura, "Arlecchino" morì annegato nel porto di Pantelleria durante un trasporto sull'isola per fecondare l'ultima fattrice rimasta. Nel 1989 l'Amministrazione Forestale Regionale, promosse un progetto al fine di reintrodurre e ricostituire questa razza e a tale scopo 3 maschi (Farfello, Acero e Argo di razza pantasca rispettivamente al 95%, 85% e 80%) e 6 femmine con una percentuale di sangue di asino Pantesco che variava dall'80% al 90% furono utilizzati come riproduttori (Bordonaro et al., 2012). Dopo circa un ventennio, l'asino Pantesco ottenne lo "standard di razza" e nel 2006 l'iscrizione al "Registro Anagrafico delle Razze/Popolazioni Equine riconducibili a gruppi etnici locali". Ad oggi questa razza ha un patrimonio di solo 77 soggetti.

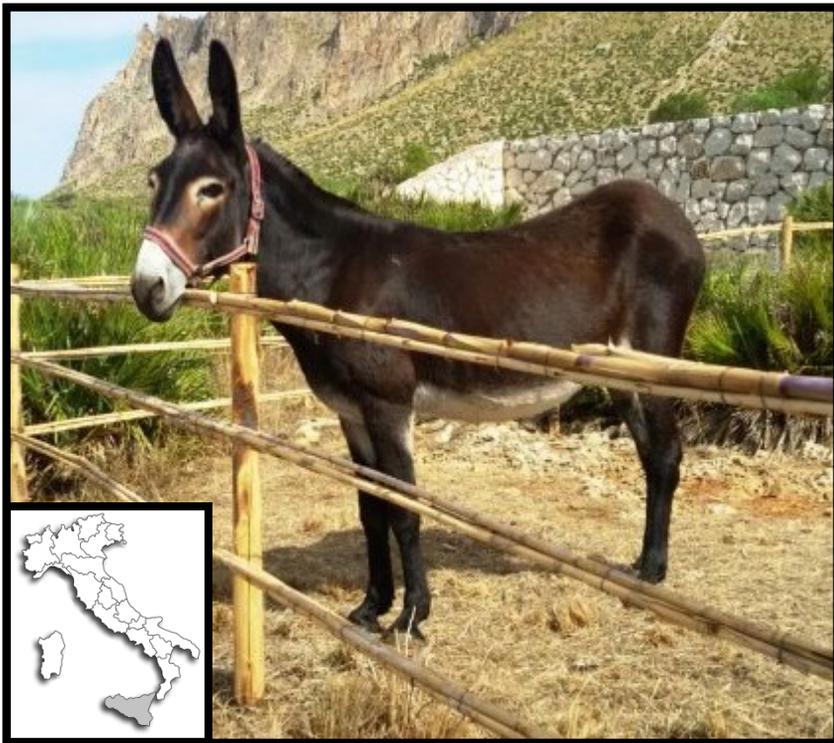


Fig. 1.12 Asino Pantesco e la sua distribuzione in Italia (Foto da www.agraria.org)

Di seguito (tabella 1.9) sono riportati i dati biometrici di questa razza asinina.

Tab. 1.9 Dati biometrici dell'asino Pantesco

	Maschi	Femmine
Altezza al garrese (cm)	124	140
Circonferenza toracica (cm)	135	160
Circonferenza stinco	16	20

Grazie alla sua naturale predisposizione ad ambiare è particolarmente adatto per l'attività di trasporto e per la sella, consentendo una notevole velocità e sicurezza di cammino.

Utilizzato in passato per la produzione mulina, l'attuale programma di recupero della razza ha previsto la produzione di muli, destinati ai lavori di montagna nelle Riserve Naturali, incrociando uno stallone Pantesco con cavalle di razza Franches-Montagnes. Attualmente viene impiegato principalmente per la produzione di latte d'asina per uso pediatrico.

1.3.9 Grigio Siciliano o Asino Ferrante

Il Grigio Siciliano o Asino Ferrante è una razza proveniente dalla Sicilia ed è allavata nelle provincie di Agrigento, Enna, Palermo, Ragusa e Siracusa. È una razza piuttosto “antica” e le sue origini si intersecano con quelle dell’asino Pantesco e dell’asino Ragusano. Chicoli (1870), descrisse in Sicilia, la presenza di due razze asinine: una razza comune (Siciliana) da lavoro, di piccola taglia con un mantello non uniforme e le regioni inferiori del corpo bianche e la razza di Pantelleria.

Un recente censimento ha evidenziato la presenza di 100 soggetti aventi un’età compresa tra i 4 mesi ed i 14 anni (Bigi e Zanon, 2008). È una razza asinina dal mantello completamente grigio, di piccola taglia e con proporzioni che non sono così eleganti come quelle dell’asino di Pantelleria (figura 1.13).



Fig. 1.13 Grigio Siciliano e la sua distribuzione in Italia (Foto F. Buono)

1.3.10 Razze italiane minori ed in via di estinzione

1.3.10.1 Asino dei Monti Lepini.

L'allevamento di questa razza risale alle zone dell'Italia Centrale dove erano diffuse le razze Marchigiana, Romagnola ed Umbra da cui sono derivate le sottorazze indigene della Toscana e del Lazio. Ad oggi questa razza asinina è allevata allo stato brado sui Monti Lepini ed è caratterizzata da un mantello scuro con o senza riga mulina (figura 1.14).

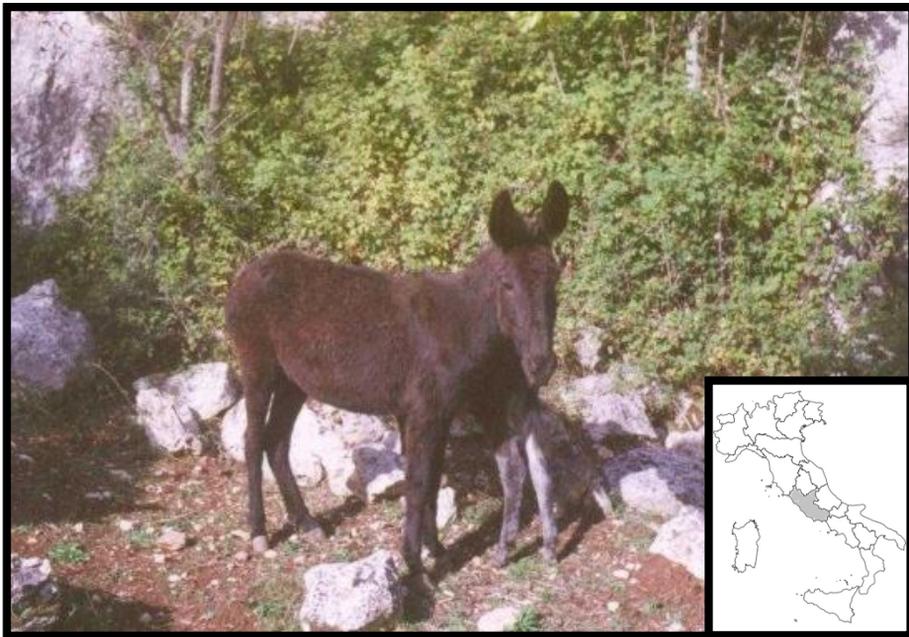


Fig. 1.14 Asino dei Monti Lepini (Foto da www.arsial.regione.lazio.it)

Le principali attitudini produttive sono da lavoro ma anche da soma, trekking, pet-therapy, equiturismo ed attacchi. È inoltre utilizzato per la produzione sia di latte che di carne.

1.3.10.2 Asino Calabrese

L'asino Calabrese è una razza asinina definita come sottorazza dell'asino Pugliese. Le origini di questa popolazione asinina sono piuttosto antiche, le prime notizie della sue esistenza risalgono al 1240 quando Federico II

ordinò a Pietro Ruffo di Calabria di rivolgersi a Ruggero, monaco di San Giovanni, perché gli fornisse buoni asini; successivamente, alla fine del XIII secolo, Carlo I d'Angiò raccomandava Eustazio di Matera, maestro delle razze di Calabria, di controllare i *caballarii* (addetti alle stalle) durante le operazioni di monta. È caratterizzato da un mantello morello, tuttavia sono presenti soggetti con un mantello baio scuro e grigio. L'addome è caratterizzato da un colore bianco che si estende fino alle regioni ascellare ed inguinale (figura 1.15).

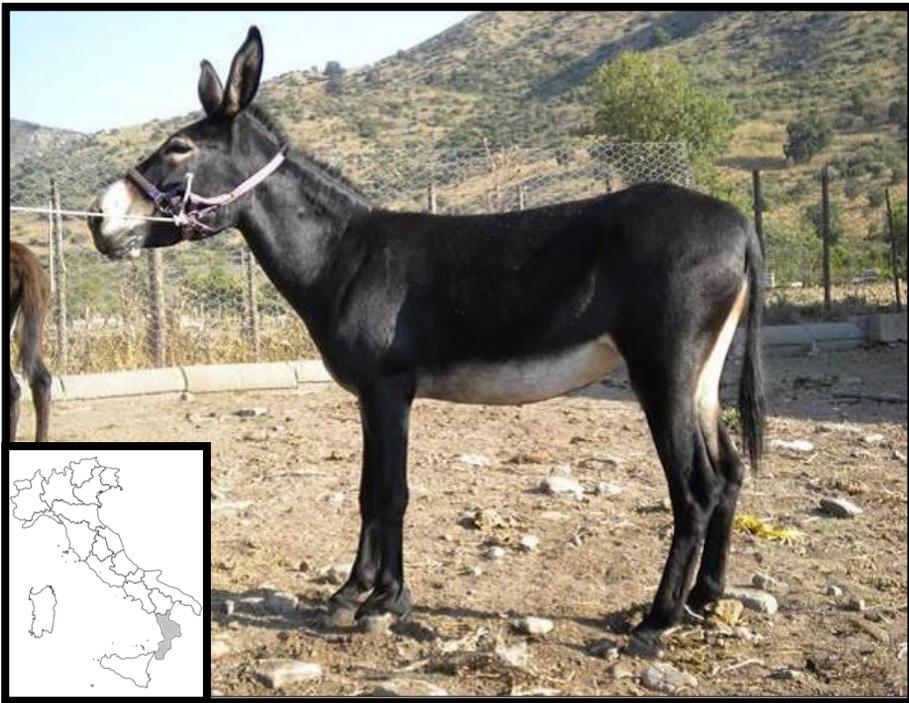


Fig. 1.15 Asino Calabrese (Foto da www.agraria.org)

1.3.10.3 Altre razze minori

Nella tabella seguente (tabella 1.10) sono indicate le altre razze minori presenti sul territorio italiano.

Tab. 1.10 Razze minori presenti in Italia

Razza	Provincia
Sant'Alberto (sin. Romagnolo)	Forlì
Emiliano	
Argentato di Sologno	
Cariovilli	Aquila (estinto)
Castel Morrone	Caserta (estinto)
Asino dell'Irpinia	Benevento ed Avellino
Asino delle Marche (sottorazza del Pugliese)	
Asino Pugliese	
Asino della Basilicata (sottorazza del Pugliese)	
Asino Leccese (sottorazza del Pugliese)	
(Probabile sin di Martina Franca)	
Asino S. Domenico	
Asino S. Andrea	
Asino S. Francesco	

1.4 Utilizzo dell'asino in Italia

In Italia, a differenza di molti altri Paesi europei, l'asino non è utilizzato unicamente come animale per scopi ludici (show e terapia assistita) ma assume una fondamentale importanza per le produzioni di latte e carne, creando una dicotomia di utilizzo di questo animale.

1.4.1 Produzione di latte

L'utilizzo del latte di asina da parte dell'uomo sia per il consumo alimentare che per la cosmetica è noto fin dall'antico Egitto (Uniacke-Lowe, 2011). Cleopatra effettuava dei bagni immergendosi nel latte di asina al fine di preservare la bellezza e la giovinezza della sua pelle. Una leggenda narra che possedeva non meno di 700 asine le quali venivano munte quotidianamente per ricavare la quantità di latte necessaria per i suoi bagni (Mansueto et al., 2013). Si narra che anche Poppea Sabina (30-65 d.C.), la seconda moglie dell'imperatore romano Nerone, effettuava bagni nel latte di asino. Plinio il Vecchio (23-79 d.C.), nella *Naturalis Historia*, suggerì il potenziale uso del latte di asina per combattere la febbre, la fatica, la stanchezza agli occhi, la caduta dei denti, le rughe, gli avvelenamenti, le ulcere, l'asma ed i problemi ginecologici.

Ippocrate (460-370 a.C.), padre della medicina, fu il primo a descrivere le proprietà curative del latte d'asina.

Il latte asinino viene spesso utilizzato in cosmetica al fine di produrre saponi e creme. Tuttavia il principale utilizzo del latte d'asina è in medicina umana come sostitutivo del latte vaccino in corso di allergie e/o intolleranza alimentare e nella prevenzione di altre patologie metaboliche, infatti, l'alta concentrazione di acidi grassi polinsaturi della serie $\omega 3$, presente nel latte d'asina, previene le malattie cardiovascolari, autoimmuni ed infiammatorie (Milonis e Polidori, 2011; Mansueto et al., 2013; Trinchese et al., 2015).

Il latte d'asina si è dimostrato efficace nel trattamento della listeriosi e della stafilococcosi (Tidona et al., 2011). L'allergia rappresenta una reazione anormale che si verifica quando una proteina (allergene) viene in contatto con i tessuti del corpo ad essa sensibili. L'allergia alle proteine del latte vaccino (APLV) è rappresentata da una reazione immunologica anormale che può innescarsi in seguito all'interazione tra una o più proteine del latte e i meccanismi immunitari. Se la reazione allergica non interessa il sistema immunitario viene allora definita intolleranza alle

proteine del latte. Il latte vaccino contiene più di 20 proteine in grado di causare reazione allergica (Docena et al., 1996), di queste proteine, le β -lattoglobuline rappresentano i principali allergeni del latte bovino (Cocco et al., 2003); a queste si aggiungono le α , le β e le κ -caseine, l' α -lattoglobuline e la lattoferrina che rappresentano i precursori dei peptidi attivi (Teschemacher et al., 1997).

L'APLV ha la sua massima incidenza durante l'infanzia e rappresenta la più frequente allergia alimentare del lattante. La maggior parte dei bambini, in genere, perde la sensibilità nei confronti di queste proteine all'età di 4 anni, tuttavia circa il 15% la mantiene per tutta la vita ed il 35% di questi presenta reazioni allergiche anche ad altri alimenti (poliallergia alimentare). Negli adulti l'APLV può manifestarsi con una reazione allergica acuta o eczema. Il fulcro della terapia dell'APLV consiste nell'eliminazione delle proteine del latte vaccino; tuttavia, nei primi anni di vita il latte vaccino ed i suoi derivati rappresentano gli alimenti attraverso i quali il neonato soddisfa almeno la metà del suo fabbisogno nutrizionale ed energetico. Proprio per questo motivo è necessario utilizzare un alimento sostitutivo che possieda caratteristiche di adeguatezza nutrizionale, appetibilità, ipo o anallergenicità e non cross-reattività con il latte vaccino. Il latte d'asina è considerato da anni un ottimo alimento per molte categorie di consumatori grazie alla sua elevate digeribilità, al suo contenuto in vitamine, sali minerali e zuccheri, tuttavia la caratteristica che ha determinato maggiore attenzione per questo alimento è la sua costituzione chimica, infatti, è molto simile a quella del latte umano se comparato con quello di altre specie animali (Vincenzetti et al., 2008; Salimei e Fantuz, 2012) (tabella 1.11).

Tab. 1.11 Composizione chimica e proprietà fisiche del latte di asina, cavalla, bovina e donna (Guo et al., 2007)

	Asina ^a	Cavalla	Bovina	Donna
Ph	7.00-7.20	7.18	6.60-6.80	7.00-7.50
Proteine (%)	1.50-1.80	1.50-2.80	3.10-3.80	0.90-1.70
Caseina (%)	0.64-1.03	0.94-1.20	2.46-2.80	0.32-0.42
Grasso (%)	0.30-1.80	0.50-2.00	3.50-3.90	3.50-4.00
Lattosio (%)	5.80-7.40	5.80-7.00	4.40-4.90	6.30-7.00
Ceneri (%)	0.30-0.50	0.30-0.50	0.70-0.80	0.20-0.30
Proteine sieriche (%)	0.49-0.80	0.74-0.91	0.55-0.70	0.68-0.83

^a da Anantkrishnan (1941)

L'elemento maggiormente rappresentato nel latte d'asina è il lattosio, il quale conferisce al latte il caratteristico sapore dolciastro (Polidori, 2006). L'elevata concentrazione di lattosio, promuovendo la crescita dei batteri lattici, caratterizzati da attività nautraceutiche e probiotiche, e stimolando l'assorbimento intestinale del calcio, aumenta la mineralizzazione delle ossa durante lo sviluppo e svolge un ruolo anche nella prevenzione dell'osteoporosi (Karotisidi et al., 2013).

Il contenuto in grasso del latte d'asina è piuttosto basso ed assume valori medi di circa 0,45%. Alabiso et al. (2005) hanno dimostrato una maggiore concentrazione di grasso nella seconda mungitura, effettuata in presenza del puledro. Nel latte di asina la concentrazione proteica media varia dall'1,7% all'1,9% e risulta essere molto simile al tenore del latte di donna che risulta essere pari all'1,74% (Polidori, 1994). Le tre principali proteine presenti nel latte di asina sono l' α -lattoalbumina, la β -lattoglobulina ed il lisozima. È stato recentemente dimostrato che l' α -lattoalbumina ed il lisozima posseggono proprietà antivirali, antitumorali ed antistress (Madhusudan et al., 2017).

Un'altra importante molecola presente nel latte di asina è la lattoferrina, (glicoproteina di 80 kDa) che svolge differenti funzioni: regola l'omeostasi del ferro interagendo con i monociti ed i macrofagi, regola la crescita e il differenziamento delle cellule e svolge un ruolo di difesa verso gli agenti patogeni (Tafaro et al., 2007) infatti, insieme al lisozima e alla lattoperossidasi, svolge azioni antimicrobiche e batteriostatiche utili nel prevenire le infezioni intestinali nei bambini (Madhusudan et al., 2017). Inoltre, sembra essere in grado di inibire lo sviluppo dell'adenocarcinoma del colon (Ward et al. 2005).

La lattoferrina oltre ad essere presente nel latte, in cui assume la concentrazione maggiore, è anche presente nei fluidi esocrini quali la saliva, le lacrime, la bile, il liquido seminale ed il succo pancreatico. Nel latte umano, la concentrazione di questa glicoproteina è abbastanza elevata (1,0 mg/ml) mentre nel bovino, nell'ovino e nella capra assume concentrazioni rispettivamente di 0,02-0,2 mg/ml; 0,14 mg/ml; 0,02-0,4 mg/ml. Nel latte di cavalla e di asina, in cui è stata recentemente determinata, assume una concentrazione pari a 0,10 mg/ml e 0,09 mg/ml.

In Italia il numero delle aziende asinine, molte delle quali sono specializzate nella produzione di latte, sembra essere stimato da 100 a 200. Le razze più comuni allevate per la produzione di latte sono il Ragusano ed il Martina Franca in maniera semiestensiva. Gli animali sono generalmente alimentati a fieno e hanno accesso al pascolo quando è disponibile. La

maggior parte delle aziende sono di piccole dimensioni con una consistenza di meno di 50 capi. Il latte può essere venduto direttamente in azienda ed il suo costo varia dai 10 ai 20 €/litro (Bordonaro et al., 2013).

In Italia un progetto sostenuto dal *The Donkey Sanctuary UK* è finalizzato alla pubblicazione di linee guida per gli asini da latte in considerazione dei principi di buone pratiche per la produzione sostenibile di latte d'asina e, conseguentemente, raccomandare soluzioni pratiche per la loro applicazione “*Guidelines for dairy donkeys: good practice principles for sustainable donkey milk production*” (<http://donkeynetwork.org.uk/>).

1.4.2 Produzione di carne

L'asino può costituire una importante fonte di carne nelle aree aride e semiaride anche se, in passato, questa produzione ha ricevuto poca attenzione. Nella maggior parte dei Paesi dove gli asini sono utilizzati come animali da lavoro e/o per la produzione di latte, questi vengono macellati in età avanzata a fine carriera ma, trattandosi di soggetti anziani, la carne risulta spesso di cattiva qualità. Questo ha generato nell'opinione comune la convinzione che la carne di asino fosse poco pregiata e potesse essere utilizzata solo per la produzione di insaccati e prodotti a base di carne (Polidori et al., 2008).

Recentemente in molti Paesi dell'area mediterranea grazie alle proprietà nutrizionali del latte d'asina l'attenzione verso l'allevamento asinino è aumentata notevolmente (Vincenzetti et al., 2008). Questo ha determinato un incremento del numero totale degli asini allevati in Sud Europa con un esubero di puledri maschi in considerazione che non tutti gli asini maschi possono essere utilizzati per il lavoro e per scopi ludici, specialmente in quei Paesi europei dove il lavoro animale è stato sostituito dalle macchine agricole e non tutti i soggetti maschi sono utilizzabili come stalloni.

La produzione di carne da animali giovani, unito alla produzione del latte d'asina potrebbe rappresentare la via per incrementare i guadagni delle aziende asinine (Polidori et al., 2008).

In Italia secondo dati Eurostat (2014) il consumo medio/anno di carne di cavallo è di circa 1,0 kg procapite, rispetto a un consumo totale procapite annuo di carne (bovina, suina, ovina ed avicole) di 76,6 kg (fonte elaborazione ASSOCARNI su dati ISMEA 2014). Il consumo di carne di asino è maggiormente diffuso nelle regioni del nord Italia come Veneto, Emilia Romagna e Piemonte ed in alcune regioni del sud Italia come la Puglia (Karotisidi et al., 2013).

La carne asinina è molto apprezzata per l'elevato contenuto proteico (22,8 g/100g di porzione edibile) e per un basso contenuto in grasso (2,0 g/100g di porzione edibile), di cui la maggior parte è rappresentato da acidi grassi insaturi (principalmente acido linoleico) e per l'elevata concentrazione di amminoacidi essenziali (Polidori et al., 2009); di conseguenza, il valore energetico (116 kcal/100 g) è inferiore se comparato a quello di altre carni rosse (Keeton e Eddy, 2004).

Nella tabella che segue (tabella 1.12) si riportano i valori delle caratteristiche chimiche del muscolo *Longissimus thoracis* come indicato da Polidori et al. (2008).

Tab. 1.12 Caratteristiche chimiche del muscolo *Longissimus thoracis* di asino

	Media	Minima	Massima
Umidità (%)	73,7	70,1	77,8
Grasso (%)	2,02	1,18	2,81
Proteine (%)	22,8	20,3	23,7
Ceneri (%)	1,01	0,89	1,23
Glicogeno (%)	0,46	0,38	0,66
Valore energetico (kcal/100 g)	116,0	96,5	125,3
Colesterolo (mg/100 g)	68,7	64,2	72,8

La correlazione tra il grasso presente negli alimenti e lo sviluppo di malattie cardiovascolari è una delle principali tematiche a cui i consumatori prestano attenzione (Pinto et al., 2002); inoltre il controllo del grasso e del colesterolo nella dieta rappresenta un punto cardine al fine di prevenire l'obesità e l'ipercolesterolemia (Karatosidi et al., 2013). L'aumento dello sviluppo di alcuni tipi di tumori, come ad esempio quello del colon, del seno e della prostata, sembrerebbe essere correlato a un eccessivo consumo di grasso animale (Reddy, 1995). È importante ricordare che il consumo di carne bovina si è notevolmente ridotto in seguito all'encefalopatia spongiforme bovina. A causa di tutte queste motivazioni, i consumatori prestano molta attenzione al consumo di nuove fonti di carni alternative come quelle equine (Pinto et al., 2007). La carne d'asino si potrebbe candidare come alternativa alle carni rosse tradizionali in considerazione del ridotto contenuto in grasso e colesterolo associato ad un elevato contenuto proteico.

1.4.3 Terapia Assistita con gli Animali

L'ippoterapia, o equitazione a scopo terapeutico, ha origini antiche perché il cavallo, con le sue straordinarie doti di sensibilità, di adattamento e di intelligenza è ritenuto, da sempre, una “medicina naturale”. L'ippoterapia agisce grazie all'interazione uomo-cavallo a livello neuro-motorio e a livello neuro-psicologico.

La prima utilizzazione del cavallo a scopo terapeutico viene attribuita ad Ippocrate di Kos che tra il V e il IV secolo a.C. pare la consigliasse ai suoi pazienti per la cura dell'insonnia. In tempi più moderni, i primi ad occuparsi di questa forma di terapia sono stati i paesi scandinavi e quelli anglosassoni (circa 70 anni fa) con lo scopo di ricercare il benessere sia fisico che mentale attraverso l'equitazione; in Germania invece si è sviluppata in seguito agli studi medici fatti nell'ambito della riabilitazione fisica, con l'obiettivo di raggiungere nei disabili una miglior postura e simmetria (Kluwer, 1992; Copeland, 1992). L'ippoterapia, detta Terapia con il Mezzo del Cavallo (TMC), è stata introdotta in Italia negli anni '70 con l'uso terapeutico del cavallo attraverso anche l'opera dell'Associazione Nazionale Italiana per la Riabilitazione Equestre (ANIRE).

La parola greca per indicare l'asino è “*onos*” e recentemente è stato coniato il termine di *onoterapia* per indicare la terapia assistita con gli animali con il supporto dell'asino, animale che ben si presta a questo scopo per la sua indole mansueta. L'asino, grazie ad alcune caratteristiche quali la piccola taglia, la morbidezza al tatto, la pazienza, i movimenti lenti, risulta particolarmente idoneo ad aiutare soggetti affetti da disabilità. Il cavalcare l'asino e l'utilizzo di tecniche di riabilitazione ed educazione rappresentano il punto chiave per il poter raggiungere un livello terapeutico in quei pazienti affetti da problematiche sensoriali, motorie ed affettive (Milonis, 2010). L'onoterapia rappresenta un metodo attivo di terapia che vede coinvolti la triade “asino – paziente – operatore” e non permette mai al paziente di restare isolato o passivo. In Italia alcuni percorsi terapeutici sono stati avviati in alcune sedi Universitarie tra le quali la Federico II con il Master Universitario di II livello in Zooantropologia sanitaria per le terapie assistite con l'ausilio di animali (TAA) e presso il Rifugio degli Asinelli ONLUS succursale del The Donkey Sanctuary con lo svolgimento di progetti continuativi nella sede della fondazione in Piemonte a Sala Biellese.



Fig. 1.16 The Donkey Sanctuary - Devon. Attività di onoterapia (Foto V. Veneziano)

Bibliografia

- Alabiso, M., Russo, G., Giosuè, C., Alicata, M.L., Torrisi, C. (2005). La produzione di latte nell'arco di una intera lattazione in asine allevate in Sicilia. *In: VII Convegno "Nuove acquisizioni in materia di Ippologia"*, Facoltà di Medicina Veterinaria di Lodi, 22-23 Giugno.
- Allen, W.R. e Short, R.V. (1997). Interspecific and extraspecific pregnancies in equids: anything goes. *Journal of Heredity*, 88: 384-392.
- Associazione Italiana Allevatori (AIA) (2012). Equidi per regione. Accessed Sep. 4, 2012. <http://www.anagrafeequidi.it/index.php?id=217>.
- Associazione Italiana Allevatori (AIA) (2017). Accessed Jul. 6, 2017. http://www.anagrafeequidi.it/tabstatistiche_Report_report.php.
- Anantakrishnan, C.P. (1941). Studies on ass's milk composition. *Journal of Dairy Research*, 12: 119-130.
- Baroncini, R. (2001). L'asino, il mulo e il bardotto. Ed. Agricole – Edizioni Agricole della Società Gruèp Calderini Edagricole, Bologna.
- Beja-Pereira, A., England, P.R., Ferrand, N., Jordan, S., Bakhiet, A.O., Abdalla, M.A., Mashkour, M., Jordana, J., Taberlet, P., Luikart, G. (2004). African origins of the domestic donkey. *Science*, 304: 1781.
- Bigi, D. e Zanon, A. (2008). Atlante delle razze autoctone: bovini, equini, ovicaprini, suini allevati in Italia. Edagricole, Milan (in Italian).
- Boessneck, J. e von den Driesch, A. (1986). Eine Equidenbestattung in spätfürhfnastischer Zeit. *Mitteilungen der Deutschen Orient-Gesellschaft*, 118: 45-50.
- Boessneck, J., von den Driesch, A., Eissa, A. (1992). Eine Eselsbestattung der 1. *Dynastie in Abusir. Mitteilungen des Deutschen Archäologischen Instituts Abteilung Kairo*, 48: 1-10.
- Bordonaro S., Guastella, A.M., Criscione A., Zuccaro A., Marletta D. (2012). Genetic diversity and variability in endangered pantesco and two other sicilian donkey breeds assessed by microsatellite markers. *Italian Journal of Animal Science*, 13(1):53-60.
- Bordonaro, S., Dimauro, C., Criscione, A., Marletta, D., Macciotta, P.P. (2013). The mathematical modeling of the lactation curve for diary traits of the donkeys (*Equus asinus*). *Journal of Dairy Science*, 96(6): 4005-4014.
- Chicoli, N. (1870). *In: Riproduzione, Allevamento e Miglioramento degli Animali domestici in Sicilia*. Stamperia de G. Lornsnidar, Palermo, pp. 131-132.
- Cocco, R.R., Järvinen, K.M., Sampson, H.A., Beyer, K. (2003). Mutational analysis of major, sequential IgE-binding epitopes in alpha s1-casein, a major cow's milk allergen. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 112(2): 433-437.
- Colli, L., Perrotta, G., Negrini, R., Bomba, L., Bigi, D., Zambonelli, P., Verini Supplizi, A., Liotta, L., Ajmone-Marsan, P. (2013). Detecting population structure and recent demographic history in endangered livestock breeds: The case of Italian autochthonous donkeys. *Animal Genetics*, 44: 69-78.
- Copeland, J. (1992). Three therapeutic aspects of riding for the disabled. *In: Therapeutic riding programs. Instruction and rehabilitation*. Barbara T. Engel, Durango, pp. 19-20.
- Di Rosa, A.R., Amato, C., Zumbo, A. (2007). Morphological traits of the Pantesco donkey. *Italian Journal of Animal Science*, 6(1): 646.

- Docena, G.H., Fernandez, R., Chirido, F.G., Fossati, C.A. (1996). Identification of caseins as the major allergenic and antigenic protein of cow's milk. *Allergy*, 51(6): 412-416.
- FAO STAT (2012). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Accessed Sep. 4, 2012. <http://faostat.fao.org/site/569/default.aspx#ancor>.
- Franco, M.M., Santos, J.B.F., Mendonça, A.S., Silva, T.C.F., Antunes, R.C., Melo, E.O. (2016). Quick method for identifying horse (*Equus caballus*) and donkey (*Equus asinus*) hybrids. *Genetics and Molecular Research*, 15(3). doi: 10.4238/gmr.15038895.
- Gandini, G. e Rognoni, G. (1997). Atlante etnografico delle popolazioni equine asinine italiane per la salvaguardia delle risorse genetiche. Ed. Cittàstudi, Torino.
- Guo, H.Y., Pang, K., Zhang, X.Y., Zhao, L., Chen, S.W., Dong, M.L., Ren, F.Z. (2007). Composition, physiochemical properties, nitrogen fraction distribution and amino acid profile of donkey milk. *Journal of Dairy Science*, 90: 1635-1643.
- Ippocrate. *The Genuine Work of Hippocrates*. Vol. 1. Sydenham Society 1843.
- Italian National Institute for Statistic (ISTAT). (2010). Available online at: <http://www.istat.it/it/>.
- Jansen, T., Forster, P., Levine, M.A., Oelke, H., Hurles, M., Renfrew, C., Weber, J., Olek, K. (2002). Mitochondrial DNA and the origins of the domesticated horse. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(16): 10905-10910.
- Karatosidi, D., Marsico, G., Tarricone, S. (2013). Modern use of Donkeys. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 3(1), 13-17.
- Keeton, J.T. e Eddy, S. (2004). Chemical and physical characteristics of meet. In: Jensen, W.K., Devince, C., Dikeman, M. (eds.), *Encyclopedia of meat science*, pp. 210-218, Oxford: Elsevier.
- Kimura, B., Marshall, F.B., Chen, S., Rosenbom, S., Moehlman, P.D., Tuross, N., Sabin, R.C., Peters, J., Barich, B., Yohannes, H., Kebede, F., Teclai, R., Beja-Pereira, A., Mulligan, C.J. (2011). Ancient DNA from Nubian and Somali wild ass provides insights into donkey ancestry and domestication. *Proceedings of the Royal Society B*, 278: 50-57.
- Kluwer, C. (1992). The federation of riding for the disabled international. In: *Therapeutic riding programs. Instruction and rehabilitation*. Barbara T. Engel, Durango.
- Madhusudan, N.C., Ramachandra, C.T., Udaykumar, N., Sharnagouda, H., Naik, N., Ram, J. (2017). Composition, characteristics, nutritional value and health benefits of milk – A review. *Dairy Science & Technology*, EDP sciences/Springer, 2017.
- Mansueto, P., Iacono, G., Taormina, G., Seidita, A., D'Alcamo, A., Adragna, F., Randazzo, G., Carta, M., Rini, G.B., Carroccio, A. (2013). Ass's milk in allergy to cow's milk protein: a review. *Acta Medica Mediterranea*, 29: 153-160.
- Milonis, E. (2010). Attività di mediazione con l'asino. Print by: *Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche*, Brescia, Italy (in Italian).
- Milonis, E. e Polidori, P. (2011). Latte di asina: produzione, caratteristiche e gestione dell'azienda asinine. Print by: *Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche*, Brescia, Italy (in Italian).
- Ministero di Agricoltura, Industria e Commercio. Divisione industria. Sezione pesca (1905). Bollettino Ufficiale. Nuova serie, Italy.
- Montanaro, C. (1930). L'asino di Martina Franca. *Rivista di Zootecnia*. Fi.
- National Consortium of Donkey Breeders (2010). Available online at: <http://www.allevasini.it/allevasini/home.do>.

- Pinto, F., Marsico, G., Alba, V., Schiavone, M., Gnoni, G.N. (2002). Impiego di acidi grassi omega 3 nell'alimentazione di puledri all'ingrasso. pp. 123-130 in *Proc. IV Congress on Nuove Acquisizioni in Materia di Ippologia*. Campobasso, (in Italian).
- Pinto, F., Schiavone, M., Marsico, G. (2007). Effects of dietary ω -3 fatty acids content on productive performances and meat quality of Martina Franca donkey foals. *Progress in Nutrition*, 9: 29-38.
- Pliny the Elder. The Natural History. *Book XXVIII "Remedies derived from living creatures"*. John Bostock 1855.
- Polidori, P. (1994). Il latte dietetico. *In: Simposio Aspetti dietetici nella produzione del latte, un alimento antico proiettato verso il futuro*. Torino, 4 novembre.
- Polidori, P. (2006). Quantificazione del lisozima nel latte di asine in fasi diverse della lattazione. *In: Atti del Secondo Convegno Nazionale sull'Asino*, 21-24 settembre, pp. 100-107.
- Polidori, P., Vincenzetti, S., Cavallucci, C., Beghelli, D. (2008). Quality of donkey meat and carcass characteristics. *Meat Science*, 80: 1222-1224.
- Polidori, P., Cavallucci, C., Beghelli, D., Vincenzetti, S. (2009). Physical and chemical characteristics of donkeys meat from Martina Franca breed. *Meat Science*, 82(4): 469-471.
- Reddy, B.S. (1995). Nutritional factors and colon cancer. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 35: 175-190.
- Rischkowsky, B. (2007). List of breeds documented in the Global Databank for Animal Genetic Resources annex to The State of the World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture (eds Pilling D.). Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Rossel, S., Marshall, F., Peters, J., Pilgram, T., Adams, M.D., O'Connor, D. (2008). Domestication of the donkey: timing, processes, and indicators. *Proceedings of the National Academy of Science*, 105(10), 3715-3720.
- Salimei, E. e Fantuz, F. (2012). Equid milk for human consumption. *International Dairy Journal*, 24: 130-142.
- Shackelford, L., Marshall, F., Peters, J. (2013). Identifying donkey domestication through changes in cross-sectional geometry of long bones. *Journal of Archaeological Science*, 40: 4170-4179.
- Short, R.V. (1997). An introduction to mammalian interspecific hybrids. *Journal Heredity*, 88: 355-357.
- Tafaro, A., Magrone, T., Jirillo, F., Martemucci, G., D'Alessandro, A.G., Jirillo, E. (2007). Immunological properties of donkey's milk: Its potential use in the prevention of atherosclerosis. *Current Pharmaceutical Design*, 13: 3711-3717.
- Teschemacher, H., Koch, G., Brantl, V. (1997). Milk protein derived opioid receptor ligands. *Biopolymers*, 43: 99-117.
- Tidona, F., Criscione, A., Guastella, A.M., Bordonaro, S., Marletta, D. (2011). Gross composition and nutritional properties of donkey milk produced in Sicily. *Journal of Science and Technology*, 62(8): 217-221.
- Trinchese, G., Cavaliere, G., Berni, C.R., Matamoros, S., Bergamo, P., De Filippo, C., Aceto, S., Gaita, M., Cerino, P., Negri R., Greco, L., Cani, P.D., Mollica, M.P. (2015). Human, donkey and cow milk differently affects energy efficiency and inflammatory state by modulating mitochondrial function and gut microbiota. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 26: 1136-1146.

- Uniacke-Lowe, T. (2011). Studies on equine milk and comparative studies on equine and bovine milk system. *PhD Thesis, University College Cork*.
- Vila, E. (2006). Data on equids from late fourth and third millennium sites in Syria. In: M. Mashkour (ed). *Equids in Time and Space. Papers in Honour of Véra Eisenmann. Proceedings of the 9th Conference of the International Council of Archaeozoology, Durhan, August 2002*. Oxbow Book, 101-123.
- Vinceti, S. (2007). Parco Nazionale dell'Asinara. Armando, Roma.
- Vincenzetti, S., Polidori, P., Mariani, P., Cammertoni, N., Fantuz, F., Vita, A. (2008). Donkey's milk protein fractions characterization. *Food Chemistry*, 106: 640-649.
- Von den Diresch, A. (1997). Tierreste aus Buto in Nildelta. *Archeofauna*, 6: 23-39.
- Ward, P.P., Paz, E., Conneely, O.M. (2005). Multifunctional roles of lactoferrin: a critical overview. *Cellular and Molecular Life Science*, 62(22): 2540-2548.
- Zeder, M.A. (1986). The equid remains from Tal-e Malyan, southern Iran. In: Meadow, R.H. and Uerpmann, H.P. (eds), *Equids in the Ancient World*, pp. 366-412, Wiesbaden: Ludwing Reichert Verlag.

Capitolo 2

Le principali elmintosi nell'asino

2.1 Introduzione

I principali endoparassiti di interesse veterinario appartengono ai taxa Nematelminti, Platelminti e in minor misura Acantocéfali.

Il phylum dei Nematelminti comprende sei classi, di cui solo quella dei Nematodi include specie di interesse parassitologico. Generalmente i nematodi sono indicati con il nome di vermi tondi, in quanto hanno un corpo cilindrico non segmentato ed una cavità corporea (pseudoceloma) contenente un fluido celomatico. Le cellule muscolari, orientate longitudinalmente, sono collocate tra l'ipoderma e la cavità celomatica.

Il corpo è ricoperto da una cuticola incolore che si approfonda nella cavità celomatica formando due corde laterali in cui si collocano i canali escretori ed una corda dorsale ed una ventrale nelle quali sono presenti i nervi (figura 2.1).

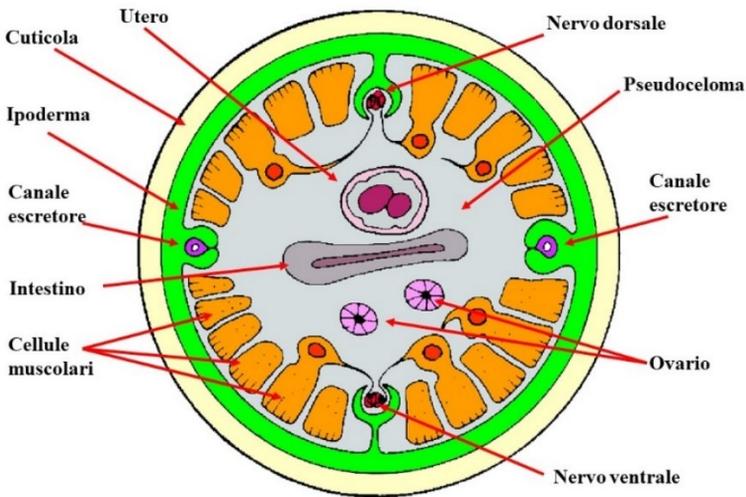


Fig. 2.1 Sezione trasversale di un nematode femmina (da Tassi P.)

Il sistema digerente è di tipo tubulare ed è costituito da una apertura orale o bocca, da un faringe muscolare, da un intestino privo di muscolatura e da una apertura anale o ano nelle femmine e cloaca nei maschi. L'apparato buccale è costituito da una apertura in diretta comunicazione con l'esofago. In alcuni casi, come avviene per esempio negli strongili, l'apertura buccale è di notevoli dimensioni e si espande a formare una capsula buccale che può essere munita di denti. L'esofago è di tipo

muscolare e la sua morfologia varia in base alla specie in: filiforme (semplice e leggermente allargato nella porzione posteriore) come nei nematodi bursati; a forma di bulbo, come negli ascaridi; a forma di doppio bulbo come negli ossiuri. In alcuni casi è costituito solo in parte da tessuto muscolare come nei filaroidi e negli spiruridi dove l'esofago è costituito da un esofago muscolare anteriore e ghiandolare posteriore (esofago muscologhiandolare). L'esofago rabditiforme è caratterizzato da un duplice ingrossamento nella porzione anteriore e posteriore ed è presente negli stadi larvali a vita libera (pre-parassitari) di molti nematodi e negli stadi adulti dei nematodi a vita libera.

Il sistema escretore è costituito da due canali che si portano all'esterno attraverso un unico poro localizzato nella porzione cefalica.

Generalmente è netto il dimorfismo sessuale, con femmine più grandi dei maschi e nel caso degli Strongylida questi possono essere caratterizzati da una espansione cuticolare nella regione caudale, la borsa copulatoria (nematodi bursati). Altre famiglie di nematodi come quella degli Oxyurida, Ascaridida e Spirurida sono, invece, sprovviste di borsa copulatrice e quindi definiti nematodi non bursati. L'apparato riproduttore femminile è costituito da ovaio, ovidutto ed utero. La vulva può essere localizzata in posizione cefalica, caudale o mediana del corpo (figura 2.2).

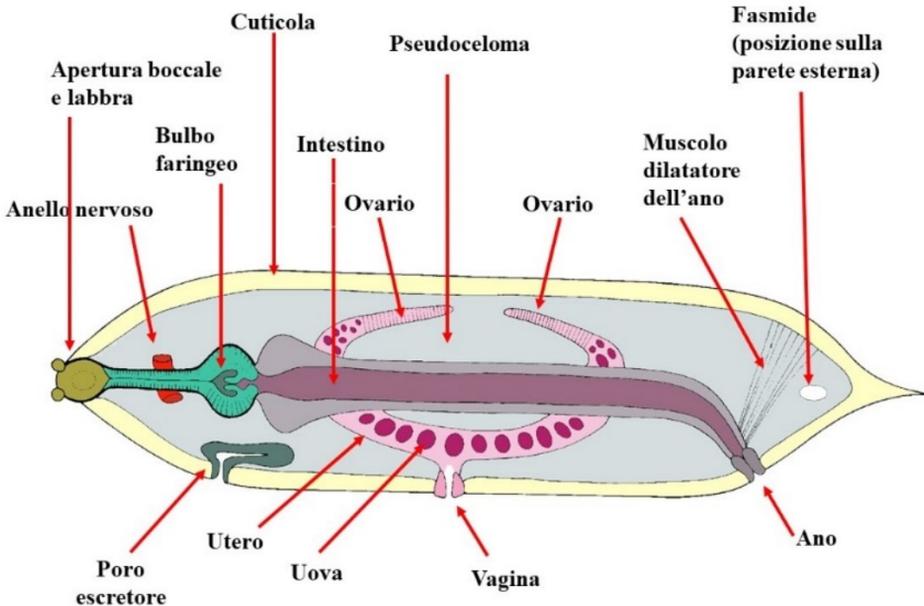


Fig. 2.2 Sezione longitudinale di un nematode femmina

Gli organi riproduttori maschili sono costituiti da un singolo testicolo che comunica con la cloaca attraverso il canale deferente. Gli organi accessori il *gubernaculum* e i due *spicula* possono rappresentare importanti caratteri identificativi. Gli *spicula* sono organi chitinosi in genere in numero di due, che sono introdotti durante la copula nella apertura genitale femminile. Il *gubernaculum* è una piccola struttura chitinoso che agisce durante la copula da scivolo nei confronti degli *spicula* (figura 2.3).

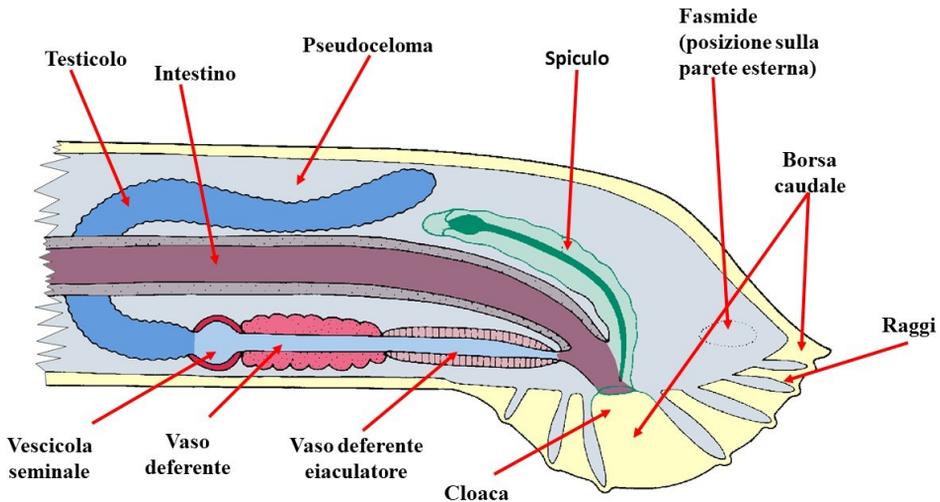


Fig. 2.3 Sezione longitudinale della porzione caudale un nematode maschio

Il phylum dei Platelminiti è costituito da due classi di vermi piatti: i Trematodi ed i Cestodi.

La classe dei Trematodi a sua volta si suddivide in due sottoclassi: Monogenea, comprendente parassiti caratterizzati da un ciclo biologico di tipo diretto e Digenea, caratterizzata da parassiti che compiono un ciclo biologico indiretto e richiedono la presenza di uno o più ospiti intermedi.

I trematodi digenei adulti detti comunemente distomi, si ritrovano nei dotti biliari, nel canale alimentare e nel sistema vascolare dell'ospite definitivo.

Questi parassiti sono appiattiti dorso-ventralmente, possiedono un apparato digerente a fondo cieco, sono caratterizzati dalla presenza di ventose che permettono l'ancoraggio ai tessuti dell'ospite e sono quasi sempre ermafroditi (figura 2.4).

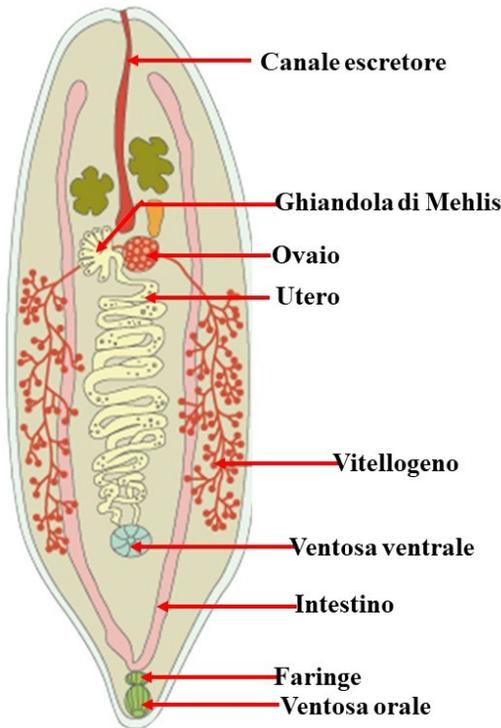


Fig. 2.4 Sezione longitudinale di un trematode digeico

In base alla localizzazione definitiva dei parassiti adulti, le uova, sono rilasciate o attraverso le feci o tramite le urine; gli stadi larvali si sviluppano in un ospite intermedio rappresentato principalmente da molluschi gasteropodi che sono quindi indispensabili per il completamento del ciclo biologico. In alcune specie è coinvolto anche un secondo ospite intermedio. La caratteristica di questo ciclo biologico è che, a differenza di quanto avviene per i nematodi in cui da un singolo uovo si sviluppa un unico parassita adulto, un uovo di trematode può dare origine a centinaia di parassiti adulti. Questo è dovuto al fenomeno della partenogenesi (riproduzione asessuata) che avviene nel mollusco. Riportando il ciclo di *Fasciola hepatica* che vede negli equidi degli ospiti suscettibili, nell'uovo l'embrione si sviluppa in una larva ciliata definita miracidio, questo, una volta all'interno dell'ospite intermedio, si sviluppa in sporociste, una struttura sacciforme in cui sono presenti numerose cellule germinative. Queste cellule sviluppano in serie le quali migrano all'epatopancreas della lumaca e danno origine poi alle cercarie. Queste, a loro volta, fuoriescono dal gasteropode e si vanno a localizzare sulla vegetazione dove si incistano

e sviluppano in metacercarie che rappresentano l'elemento infettante per l'ospite definitivo. Una volta ingerita, la metacercaria raggiunge la sede intestinale e penetra nell'intestino per poi migrare verso il sito d'elezione come adolescaria dove diventa parassita adulto nell'arco di alcune settimane.

I cestodi, differiscono dai trematodi in quanto sono caratterizzati da un corpo nastriforme segmentato e sono sprovvisti del canale alimentare.

I parassiti appartenenti alla Classe Cestoda si suddividono in due ordini: Cyclophyllidea e Pseudophyllidea. I parassiti appartenenti a questi due ordini, seppur molto simili morfologicamente, differiscono fra loro in quanto gli Pseudophylloidea sono caratterizzati da uno scolice privo di ventose, con due solchi longitudinali chiamati botri e le uova sono caratterizzate da una membrana robusta, brunastra ed opercolata.

La maggior parte dei cestodi di interesse veterinario è compresa nell'ordine dei Cyclophyllidea.

Il cestode adulto è costituito da una testa o scolice, un piccolo collo non segmentato ed una catena di segmenti definiti proglottidi che nel loro insieme costituiscono lo strobila (figura 2.5).

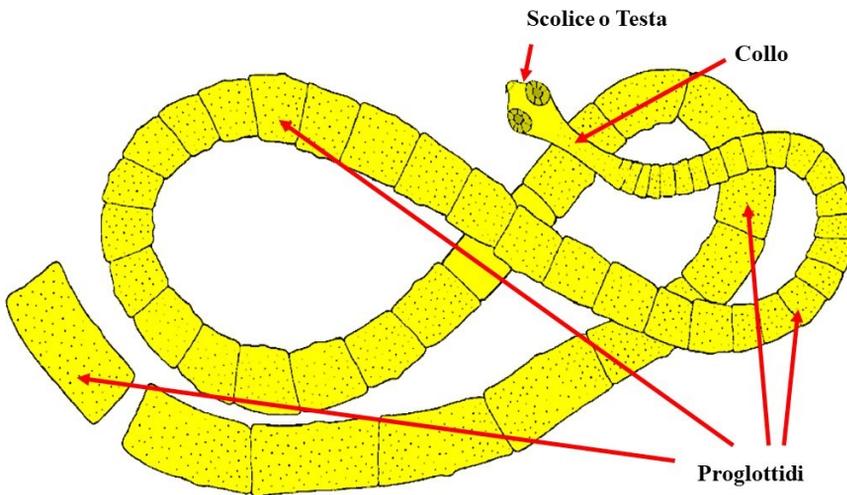


Fig. 2.5 Struttura di un cestode ciclofillideo: scolice, collo e strobila.

Il parassita si ancora all'intestino grazie alla presenza di ventose, che in alcuni casi possono anche essere provviste di uncini. Le proglottidi si originano dalla regione del collo e diventano sessualmente mature durante

la progressione lungo lo strobila. Ogni proglottide è emafrodita ed è possibile sia la fecondazione crociata che l'autofecondazione (figura 2.6)

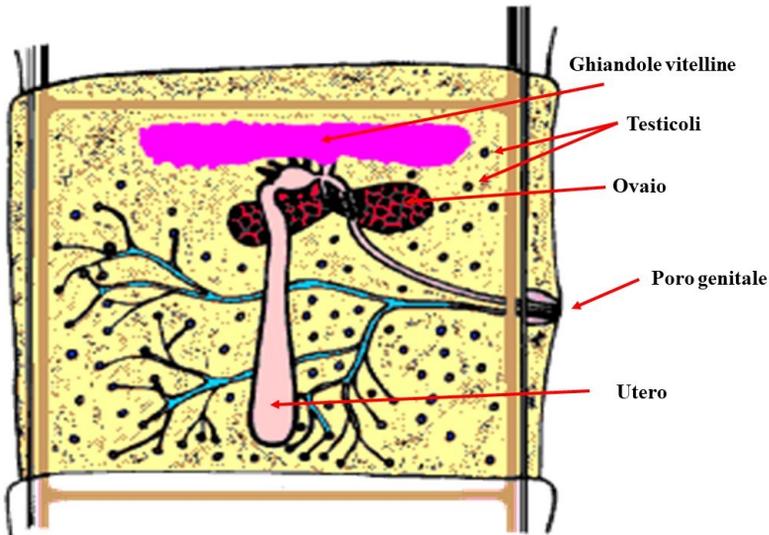


Fig. 2.6 Struttura di un cestode ciclofillideo: proglottide matura con gli apparati riproduttivi.

Il ciclo biologico è indiretto ed è caratterizzato da uno o più ospiti intermedi. L'uovo contiene un embrione esacanto, dotato di sei uncini, definito anche oncosfera; una membrana definita embrioforo ed un guscio esterno. Quando l'uovo viene ingerito dall'ospite intermedio, le secrezioni gastriche ed intestinali digeriscono l'embrioforo ed attivano l'oncosfera la quale si sviluppa, in base alla specie, in uno degli stadi larvali, conosciuti nel complesso con il nome di metacestode. Quando il metacestode è ingerito dall'ospite definitivo, lo scolice si ancora alla mucosa ed inizia a produrre la catena di proglottidi.

Le famiglie di interesse veterinario sono: *Taeniidae*, *Anoplocephalidae*, *Dilepididae*, *Davaineidae*, *Hymenolepididae*, *Mesocestoididae* e *Thysanosomidae*.

2.2 Ordine Strongylida: Superfamiglia Strongyloidea

I nematodi che normalmente parassitano gli equidi comprendono 7 sottordini, 12 famiglie, 29 generi e 83 specie; di cui 64 appartengono alla sola superfamiglia degli Strongyloidea (Lichtenfels et al., 2008).

L'ordine Strongylida è costituito da quattro superfamiglie:

1. Strongyloidea; fatta eccezione per *Syngamus* e *Mammomonogamus* che sono parassiti della trachea e dei grossi bronchi e *Stephanurus* che si rinviene nella regione perirenale, è costituita da generi che si localizzano nel intestino e si suddividono in due gruppi, strongili e anchilostomi;
2. Trichostrongyloidea; sono parassiti di piccole dimensioni che si riscontrano nel tratto alimentare dei mammiferi e degli uccelli fatta eccezione per *Dictyocaulus* che è un parassita a localizzazione polmonare;
3. Ancylostomatoidea; nematodi uncinati che si rinvencono a carico del piccolo intestino;
4. Metastrongyloidea; parassiti del polmone e dei vasi ematici adiacenti.

Alle prime due superfamiglie appartengono la maggior parte degli elminti parassiti degli equidi.

La superfamiglia Strongyloidea, comprende la famiglia Strongylidae, a sua volta, costituita da due sottofamiglie: Strongylinae, caratterizzati da una capsula buccale globulare o a forma di imbuto e Cyathostominae (CY) caratterizzati da una capsula buccale cilindrica (Lichtenfels et al., 2008). Comunemente i parassiti appartenenti a queste due sottofamiglie vengono indicati con il nome di strongili intestinali (SI). La differenziazione morfologica degli SI dell'asino, così come del cavallo, è basata sulle caratteristiche della porzione cefalica (Lichtenfels et al., 2008).

Le quattordici specie di parassiti appartenenti alla sottofamiglia delle Strongylinae sono suddivise in cinque generi: *Strongylus* (Müller, 1970), *Oesophagodontus* (Railliet e Henry, 1902), *Craterostomum* (Boulenger, 1920), *Bidentostomum* (Tschojjo, 1957) and *Triodontophorus* (Looss, 1902); tuttavia questa classificazione non è accettata da Skrjabin che, seguendo la classificazione proposta da Ershov (1943), suddivide il genere *Strongylus* in tre generi.

Secondo Lichtenfels et al. (2008) il genere *Strongylus* si suddivide in tre specie, *S. vulgaris*, *S. edentatus* e *S. equinus* che parassitano cavalli, asini, muli e zebre ed una quarta specie, *S. asini* (Boulenger, 1920) che è stata riscontrata nelle zebre e negli asini mentre i cavalli sono meno suscettibili all'infezione sia sperimentale (Malan et al., 1982) che naturale (Malan, comunicazione personale). I nematodi appartenenti a *Strongylus* spp. sono comunemente identificati con il nome di grandi strongili (GS) e la loro dimensione oscilla dai 2 ai 5 cm, presentano un corpo tozzo e di colore rosso scuro e sono facilmente visibili sulla mucosa intestinale. La capsula buccale è di forma globulare e può presentare denti prominenti che sono caratteristici nelle diverse specie (figura 2.7):

- *S. vulgaris*: la cavità buccale presenta due denti arrotondati; i parassiti adulti misurano circa 2 cm;
- *S. edentatus*: la cavità buccale è priva di denti; i parassiti adulti misurano circa 4 cm
- *S. equinus*: la cavità buccale è caratterizzata dalla presenza di 3 denti di cui uno bifido, posto dorsalmente, ed è più grande degli altri due; i parassiti adulti misurano circa 5 cm.
- *S. asini*: la cavità buccale presenta un unico dente bilobato; i parassiti adulti misurano circa 4 cm.

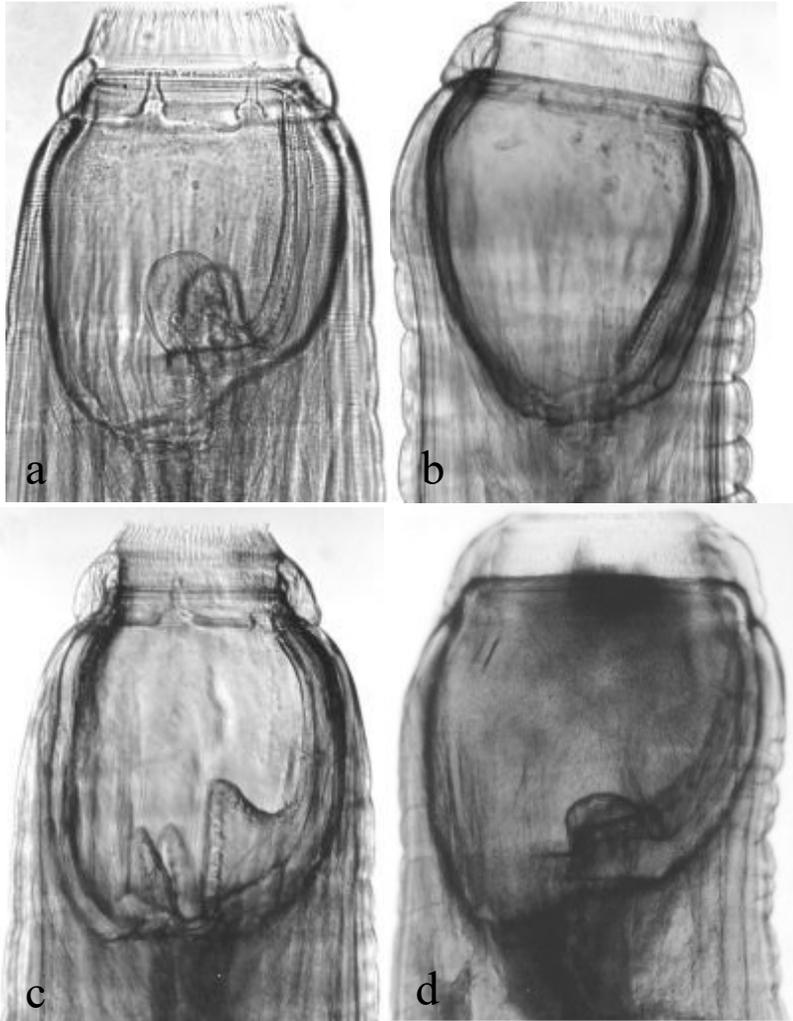


Fig. 2.7 Caratteristiche della capsula buccale degli SI
a) S. vulgaris; b) S. edentatus; c) S. equinus; d) S. asini (Lichtenfels et al., 2008)

I CY, comunemente identificati con il nome di piccoli strongili, sono caratterizzati da dimensioni inferiori rispetto ai GS raggiungendo massimo i 2,5 cm di lunghezza.

Le 50 specie appartenenti alla sottofamiglia Cyathostominae sono suddivise in 14 generi: *Cyathostomum* spp. (Molin, 1861), *Coronocyclus* (Hartwich, 1986), *Cylicocyclus* (Ihle, 1922), *Cylicodontophorus* (Ihle, 1922), *Tridentoinfundibulum* (Tshoijo in Popova, 1958), *Cylicostephanus* (Ihle, 1922), *Skrjabinodentus* (Tshoijo in Popova, 1958), *Petrovinema* (Ershov, 1943), *Parapoteriostomum* (Hartewich, 1986), *Poteriostomum* (Quiel, 1919), *Gyalocephalus* (Looss, 1900), *Hsiungia* (K'ung e Yang, 1964), *Caballonema* (Abuladze, 1937) e *Cylindropharynx* (Leiper, 1911). *Cylicocyclus asinus* rappresenta, nell'asino, la specie più recentemente descritta ed è stata rinvenuta nel colon ventrale di sette asini domestici allevati nel sud Africa (Matthee et al., 2002).

Tab. 2.1 Classificazione della superfamiglia Strongyloidea

Famiglia	Subfamiglia	Genere
Strongyloidea	Strongylinae	<i>Strongylus</i>
		<i>Oesophagodontus</i>
		<i>Craterostomum</i>
		<i>Bidentostomum</i>
		<i>Triodontophorus</i>
	Cyathostominae	<i>Cyathostomum</i>
		<i>Coronocyclus</i>
		<i>Cylicocyclus</i>
		<i>Cylicodontophorus</i>
		<i>Tridentoinfundibulum</i>
		<i>Cylicostephanus</i>
		<i>Skrjabinodentus</i>
		<i>Petrovinema</i>
		<i>Parapoteriostomum</i>
<i>Poteriostomum</i>		
<i>Gyalocephalus</i>		
<i>Hsiungia</i>		
<i>Caballonema</i>		
<i>Cylindropharynx</i>		

I parassiti adulti appartenenti alla superfamiglia Strongyloidea vivono nel grosso intestino di cavalli, asini ed altri equidi (zebra ed ibridi). Essi costituiscono circa la metà delle 100 specie degli endoparassiti degli equidi e si riscontrano in oltre il 90% della popolazione equina (Nielsen et al., 2006). I CY rappresentano i parassiti di maggiore diffusione (Corning,

2009) e sono considerati i principali responsabili di malattie parassitarie e scarso rendimento nelle scuderie equine (Traversa et al., 2010).

2.2.1 Ciclo biologico

Tutte le specie di strongili intestinali che parassitano gli equidi sono caratterizzati da un ciclo biologico diretto (Kuzmina et al., 2006). Le femmine adulte depongono le uova (75-93 x 41-54 μm) in sede intestinale, queste passano nell'ambiente esterno attraverso le feci dove schiudono e liberano una larva di primo stadio (L1) che sviluppa a sua volta in una larva di secondo (L2) e di terzo stadio (L3). La L3 rappresenta l'elemento infettante e il suo periodo di sopravvivenza nell'ambiente esterno è condizionato da fattori ambientali quali la temperatura e l'umidità (Soulsby, 1982; Urquhart et al., 1996). La temperatura minima che permette la schiusa dell'uovo è di 7-8°C (Ogbourne, 1975) e in condizioni ottimali la L3 si sviluppa in circa 10 giorni; tuttavia è stato suggerito che in ambienti caldi, le uova possono schiudere rapidamente e la L3 si possa sviluppare in 3 giorni (Corning, 2009). La L3 sul pascolo è racchiusa nella cuticola della L2 che la protegge dalla disidratazione e la permette di sopravvivere in condizioni ambientali sfavorevoli. Dopo l'ingestione, la L3, in seguito a stimoli chimici presenti a livello intestinale, si libera del suo strato protettivo e inizia la fase interna di sviluppo che è differente a seconda della specie parassitaria (Khan et al., 2015). Le larve dei grossi strongili emergono attraverso una apertura nella regione cefalica di questo strato protettivo, mentre quelle dei piccoli strongili emergono attraverso una fessura prossima all'esofago (Kuzmina et al., 2012). Mentre le larve dei GS migrano nei tessuti dell'ospite per un periodo di tempo che varia, in base alla specie, da un minimo di 6 mesi ad un massimo di 1 anno (tabella 2.2) (Urquhart et al., 1996; Osterman, 2005), quelle dei CY scavano delle gallerie a livello delle ghiandole del cieco e del colon dove mutano a larve di quarto (L4), quinto (L5) stadio (Eysker et al., 1986; Gasser et al., 2004; Reinemeyer, 2009) e poi a parassita adulto senza compiere migrazioni interne.

2.2.1.1 Grandi strongili

S. vulgaris. La L3 dopo essere stata ingerita dall'ospite definitivo, generalmente al pascolo, penetra nella mucosa e nella sottomucosa dell'ileo, del cieco e del colon ventrale causando edema e dilatazione delle

piccole arterie, vene e capillari (Duncan e Pirie, 1972; Duncan, 1973). Trascorsi quattro-cinque giorni dall'infezione, la L3 muta ad L4 la quale penetra nelle arteriole a livello della sottomucosa (Enigk, 1970) per poi migrare a livello del sistema circolatorio dell'intestino. Tra l'undicesimo e il quartordicesimo giorno post-infezione la L4 raggiunge le arterie ileo-cieco-coliche e mesenterica craniale (Enigk, 1970; Ershov, 1970; Duncan e Pirie, 1972). Dopo un periodo di sviluppo che dura alcuni mesi, la L4 muta ad L5 e queste ritornano in sede intestinale dove si incistano in noduli (Enigk, 1951; Duncan e Pirie, 1972). Al fine del raggiungimento della maturità sessuale sono necessarie altre 6-8 settimane (Duncan e Pirie, 1972; Duncan, 1974a). Il periodo di prepatenza è di circa 6-7 mesi (Duncan e Pirie, 1972) e non ci sono evidenze di infezione prenatale (Drudge et al., 1966).

S. edentatus. Dopo l'ingestione e la penetrazione nella mucosa intestinale, la L3 raggiunge il parenchima epatico attraverso il sistema portale. Dopo due settimane la L3 muta ad L4 la quale raggiunge il fegato e dopo altri 4 mesi muta ad L5. La L5 migra, al di sotto della lamina peritoneale, sino alla parete del grosso intestino dove si incista in noduli purulenti. In seguito alla rottura di questi noduli il parassita si libera nel lume intestinale. Il periodo di prepatenza, generalmente, è di circa 10-12 mesi (Enigk, 1970), ma può essere anche più breve e durare circa 6 mesi (McCraw e Slocombe, 1976).

S. equinus. Dopo essere stata ingerita, la L3 provoca la formazione di noduli a livello dello strato muscolare e sottosieroso del grosso intestino; in questi noduli muta ad L4, la quale migra attraverso la cavità peritoneale sino al fegato; in questa sede la L4 effettua una serie di migrazioni per circa 6 mesi. Dopo questo periodo è possibile rinvenire a livello pancreatico la L4 e la L5 che migra nuovamente in sede intestinale. I parassiti adulti si riscontrano a livello del colon ventrale di destra e del cieco (Dunn, 1978) e non sono di così comune riscontro come *S. vulgaris* e *S. edentatus*. Il periodo di prepatenza è di circa 8-9 mesi.

S. asini. Il ciclo di questo parassita non è ben noto. In seguito ad infestazione sperimentale di 3 equidi domestici (un cavallo, un asino ed un mulo) ed una zebra (Malan et al., 1982), l'asino e la zebra si sono dimostrati gli ospiti maggiormente sensibili ed entrambi hanno manifestato debilitazione nella fase terminale dello studio. Noduli ascrivibili alla

presenza del parassita sono stati rinvenuti a livello della vena porta con una maggiore prevalenza nella zebra rispetto all'asino nel quale invece fenomeni tromboembolici si sono manifestati a carico di questo vaso. Questo potrebbe spiegare che parte dello sviluppo larvale di *S. asini* potrebbe svolgersi a livello della vena porta. Se così fosse, potrebbe essere paragonata all'endoarterite provocata dalle larve di *S. vulgaris* a carico dell'arteria mesenterica craniale. Al momento della macellazione, 117-125 giorni post infezione, le L4 di *S. asini* sono state rinvenute a livello della vena porta e del fegato della zebra, del cavallo e dell'asino ma non del mulo. In base a questo studio il ciclo biologico di *S. asini* potrebbe essere schematizzato nel modo seguente: intestino – penetrazione a livello del sistema portale – migrazioni a livello del parenchima epatico – sistema portale – riscontro dei parassiti adulti nel cieco e nel colon.

2.2.1.2 Piccoli strongili

Gli elminti adulti dei Cyathostominae vivono nel grosso intestino (cieco e colon) e sono caratterizzati da un ciclo biologico non associato a migrazioni extraintestinali (Soulsby, 1982; Urquhart et al., 1996). Nel caso di una singola infezione, il periodo di prepatenza medio è di 53 giorni (48-62), tuttavia, nel caso di infezioni multiple è stato riportato un periodo di prepatenza medio di 65 giorni (60-77) (Love e Duncan, 1992).

Passate all'esterno attraverso le feci, le uova schiudono e rilasciano le L1 che mutano a L2. Questi due stadi larvali presentano esofago rabdiforme e si nutrono di batteri per poi mutare a L3, elementi parassitari con doppia cuticola che non permette di alimentarsi (Nielsen et al., 2007). Dopo l'ingestione, le L3 continuano il loro sviluppo nel lume intestinale, attraverso un ciclo definito "rapido" e il periodo di prepatenza è di circa 5-6 settimane. In alcune condizioni, tuttavia, lo stadio iniziale delle L3 può incistarsi nella sottomucosa e arrestare il proprio sviluppo per un periodo di tempo che può variare dai 4 mesi ai 2 anni (Proudman e Matthew, 2000; Coles et al., 2003). Questo spiegherebbe il grosso numero di larve incistate che è possibile riscontrare a livello intestinale (Gibson, 1953; Smith 1976a,b). Il numero delle EL3 inibite tende ad aumentare con l'età dell'ospite come risultato di una risposta immunitaria nei confronti del parassita (Chapman et al., 2003). Non è ampia la bibliografia sul fenomeno dell'ipobiosi nell'asino Eysker e Pandey (1987).

2.2.2 Patogenesi e segni clinici

Cavalli e asini sono contemporaneamente parassitati da grandi e piccoli strongili. Gli asini, a differenza dei cavalli, anche se parassitati da una elevata carica di elminti, appaiono in buone condizioni fisiche ed è raro osservare segni clinici come diarrea, perdita di peso, coliche o scadimento organico (Matthews e Burden, 2013).

I CY rappresentano gli strongili che maggiormente si rinvencono nei cavalli (Matthews, 2008), negli asini lo scenario parassitologico vede associato ai piccoli strongili una presenza ancora elevata di grandi strongili. Alcuni studi condotti sugli asini in Grecia e Macedonia (Sotiraki et al., 1997) Sud Africa (Well et al., 1998) ed Etiopia (Getachew, 1999), hanno dimostrato infatti, una elevata prevalenza di *S. vulgaris*. Risultati analoghi erano stati rinvenuti in passato da Vercruyssen et al. (1986), i quali, in seguito ad esame necroscopico di 30 asini hanno rinvenuto la presenza di *S. vulgaris* nel 100% dei soggetti, seguito da *S. edentatus* (90%), *S. equinus* (60) e *S. asini* (10%).

Negli equidi, le forme adulte degli SI, generalmente, non sono caratterizzate da un elevato potere patogeno che invece sembra essere notevole per gli stadi larvali (in L4 e L5).

Gli stadi larvali di *S. vulgaris*, trascorrendo gran parte del loro tempo nell'arteria mesenterica craniale e le sue principali diramazioni, si rendono responsabili di processi patologici che influenzano negativamente lo stato di salute degli ospiti (Maxie e Robinson, 2007). Inoltre, le reazioni infiammatorie a carico dei vasi sanguigni rappresentano un fattore predisponente per l'insorgenza di coliche, infatti, Coffman e Carlson (1971) hanno riportato che nel cavallo il 10% delle morti legate a fenomeni tromboembolici erano ascrivibili alle infezioni sostenute da *S. vulgaris*. Questo parassita può anche essere responsabile di infarcimento e successiva necrosi intestinale, su base non strangolante (Nielsen et al., 2016a).

Anche se nell'asino la patogenesi di *S. vulgaris* non è stata ampiamente studiata, sono stati riscontrati effetti simili a quelli descritti nel cavallo e, nella specie asinina la frequenza di fenomeni colici correlati all'infezione da *S. vulgaris* è inferiore rispetto al cavallo (13% vs 88%) (Veneziano, 2011). Borji et al. (2014) hanno riportato un caso di decesso di un asino di 8 anni, non sottoposto a regolari trattamenti antiparassitari, conseguente all'ostruzione dell'arteria mesenterica craniale da larve di *S. vulgaris* (figura 2.8). L'arterite verminosa (arterite trombotica) rappresenta

l'infiammazione dell'arteria mesenterica craniale causata da larve di *S. vulgaris* ed è caratterizzata da lesioni endoteliali e formazione di trombi nel lume vascolare (Marinković et al., 2009). Quando le larve ritornano in sede intestinale, le lesioni a carico dei vasi tendono a guarire (Duncan e Pirie, 1975). Le lesioni provocate da *S. vulgaris* sono maggiormente frequenti a carico dell'arteria mesenterica craniale (incidenza 86%) e ileo-cieco-colica (incidenza 62,5%) (Ottaway e Bingham, 1946; Poynter, 1960).

Uno studio necroscopico su 12 asini, condotto in Kenya da Lewa et al. (1998), ha evidenziato, nel 42% dei soggetti, trombo-arteriti con differente grado di severità.

Con il termine “anaeurisma verminoso” si indica, invece, lo sfiancamento della parete vasale in seguito alla presenza delle larve di *S. vulgaris*. Questa patologia è presente in tutto il mondo ed è più comune nei cavalli giovani, anche se si può riscontrare anche in soggetti adulti (Lyons et al., 2006). Maxie e Robinson (2007) non considerano l'anaeurisma come un reperto correlato all'arterite verminosa, contrariamente altri ritengono che l'anaeurisma sia una conseguenza dell'arterite verminosa (Klei et al., 1990).

Khallayoune (1991) in seguito a studi necroscopici effettuati su un totale di 168 asini da lavoro ha riscontrato aneurismi nell'87% dei soggetti.

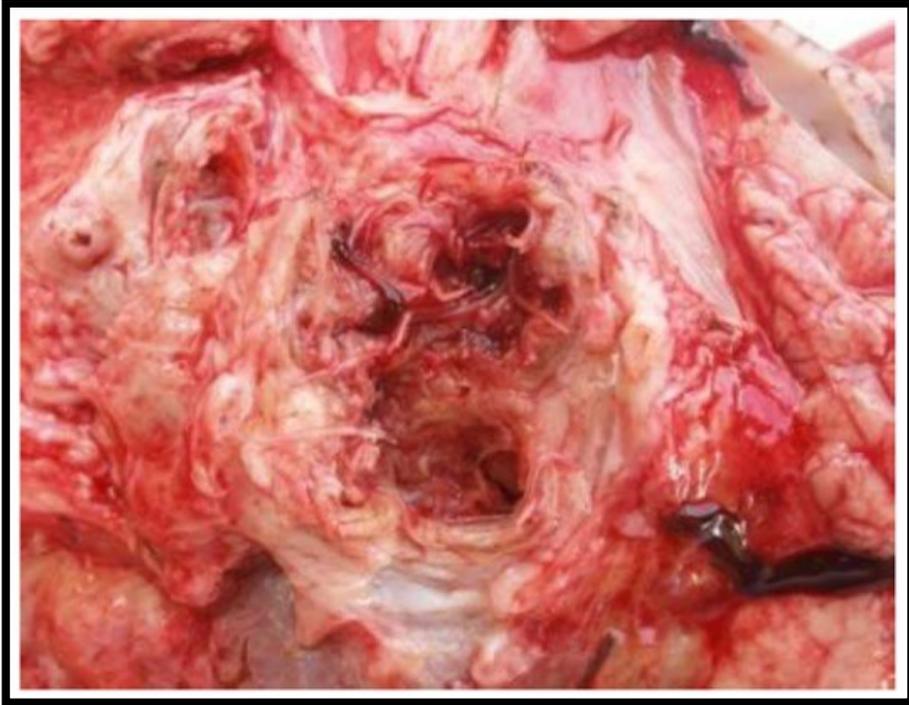


Fig. 2.8 Sezione trasversale dell'arteria mesenterica craniale con larve di *S. vulgaris*
(Foto da Borji et al., 2014)

I segni clinici riscontrabili in corso di migrazione di larve di *S. vulgaris* si verificano durante le prime settimane post infezione. Drudge et al. (1966) hanno dimostrato, successivamente all'inoculazione sperimentale di larve infettanti in puledri, un aumento della temperatura corporea, perdita di appetito con conseguente rapida perdita di peso corporeo, depressione e decubito, dolori addominali, costipazione e/o diarrea intermittente che tuttavia è più comune nel corso di infezioni da piccoli strongili che non in corso di infezioni da grandi strongili (McCraw e Slocombe, 1976).

Il potere patogeno sostenuto da larve erratiche di *S. vulgaris* è stato riportato in un asino di 2 anni nel quale si è avuto una migrazione erratica di una L5, a livello del midollo spinale con conseguente paraparesi e successivamente tetraplegia. È stata inoltre riscontrata una mielite granulomatosa con lesioni emorragiche e necrotiche molto simili a quelle causate dalla mieloencefalite equina (Mayhew et al., 1984).

Le lesioni cliniche sostenute dai GS, in particolar modo da *S. vulgaris*, associate al ritrovamento di una elevata carica di piccoli strongili in

animali apparentemente sani, hanno fatto erroneamente credere che i CY avessero un limitato potere patogeno. Tuttavia, in seguito ad una sintomatologia clinica caratterizzata da perdita di peso, diarrea e in alcuni casi morte del soggetto l'attenzione nei confronti di questi parassiti è andata crescendo (Love et al., 1999). Infatti, quando la carica parassitaria dei CY è elevata, questi parassiti possono compromettere seriamente la salute degli animali parassitati (Matthews, 2008, 2014).

I CY sono stati associati anche a colica da intuscepto cieco-cecale (Mair et al., 2000), timpanismo cecale (Murphy et al., 1997) ed infarcimento intestinale non strangolante (Mair e Pearson, 1995).

Come per il cavallo anche l'asino presenta una suscettibilità ai CY, che però risulta variabile da soggetto a soggetto. Generalmente, in una popolazione di asini con un buon management, la maggior parte degli animali presenta una infezione sotto controllo. Questo si manifesta con una bassa eliminazione di uova nella maggior parte degli animali. L'infezione da CY tende ad essere più elevata negli asini giovani, specialmente in quelli con pascolo permanente.

Le larve di CY sono caratterizzate da una spiccata azione patogena e sono responsabili di una sindrome clinica definita *cyathostomiasi larvale* (Love et al., 1999) caratterizzata da un'inflammazione acuta (tiflo-colite) dell'intestino provocata dalla emersione sincrona, a livello del lume intestinale, delle larve dei piccoli strongili incistate nella sottomucosa.

Nel cavallo i segni clinici della *cyathostomiasi larvale* sono caratterizzati da diarrea acquosa profusa che in alcuni casi può trasformarsi in emorragica, disidratazione, iponatriemia ed edemi ventrali (Nielsen e Lyons, 2017). In alcuni casi è stata descritta una sindrome fatale nel 50% dei soggetti caratterizzata da diarrea cronica ed emaciazione (Gasser et al., 2004). La *cyathostomiasi larvale* sembrerebbe avere un andamento stagionale (tardo inverno/inizio primavera) e generalmente si verifica in soggetti giovani di età compresa tra 1 e 3 anni (Peregrine et al., 2014); questo potrebbe essere associato al fatto che all'evata percentuale di EL3 (60-70%) riscontrata in pony naturalmente infettati di età variabile tra i 2 e 5 anni (Chapman et al., 2003). Il fenomeno della *cyathostomiasi larvale* è stata paragonata da alcuni autori all'ostertagiosi tipo II dei bovini (Soulsby, 1986).

Anche negli asini, le larve incistate di CY possono aumentare in gran numero ed emergere in maniera sincrona determinando la *cyathostomiasi larvale*. Questo fenomeno può essere associato a uno o tutti i seguenti sintomi: perdita di peso improvvisa, coliche e raramente diarrea. Il tasso di

mortalità associato a ciatostomiasi larvale negli asini non è noto, anche se in questa specie sembra essere inferiore a quello osservato nei cavalli dove si avvicina al 50%. Recentemente un caso mortale associato a *cyathostomiasi larvale* è stato riportato in un asino da lavoro in Iran (Oryan et al., 2015). La sintomatologia clinica associata alle infezioni da parte dei CY negli asini non è ancora del tutto chiara; alcuni studi suggeriscono che i CY si renderebbero responsabili di uno scarso BCS e di alterazioni ematiche quali anemia (Matthee et al., 2002). Questi reperti sono tuttavia in contrasto con quanto riportato da Burden et al. (2010) che non hanno riscontrato una correlazione tra questa parassitosi e un ridotto valore di BCS. Le alterazioni ematologiche che si possono riscontrare in corso di infezione da CY nel cavallo sono caratterizzate da anemia, diminuzione della concentrazione di emoglobina e del volume plasmatico, eosinofilia e leucocitosi (Matthee et al., 2002). È stato inoltre riscontrato un aumento delle beta-globuline, neutrofilia ed ipoalbuminemia (Murphy et al., 1997). Nessuno dei segni clinici, tuttavia, è patognomnico d'infezione da strongili intestinali.

2.2.3 Epidemiologia

Gli strongili intestinali degli equidi, essendo capaci di adattarsi ad un ampio range di condizioni climatiche, sono parassiti a distribuzione cosmopolita. In Italia, un recente studio condotto da Zidda et al. (2016) su 3881 cavalli appartenenti a 292 scuderie ha dimostrato una prevalenza di SI pari al 42,1%. Un'altra ricerca condotta nelle regioni meridionali italiane sulle principali elmintosi dei cavalli, ha evidenziato una prevalenza degli SI pari al 61,6% (Pacifico et al., 2016).

Le uova di questi elminti sono escrete attraverso le feci dalle quali si sviluppa, in circa 2-4 giorni, la L1.

Baker et al. (1939) e Ogbourne (1972) hanno dimostrato che la percentuale di schiusa delle uova è direttamente proporzionale alla temperatura ambientale; a temperature comprese tra 25-33°C la schiusa avviene in 24 ore; al di sotto dei 5°C le uova restano vitali ma non si schiudono (Mfitilodze e Hutchinson, 1987) mentre a temperature superiori ai 40°C si ha la loro distruzione (tabella 2.2).

Tab. 2.2 Temperatura e sviluppo delle larve di strongili intestinali dalla schiusa a L3

Temperatura	Percentuale (%) di L3	Tempo di sviluppo delle L3
< 8° C	0	---
10° C	3	> 35 giorni
12° C	17	26 giorni
15° C	35	16 giorni
20° C	55	8 giorni
22° C	65	6 giorni
25° C	68	5 giorni
28° C	44	4 giorni
30° C	32	3 giorni
35° C	10	2 giorni
> 38° C	0	---

Mifitildodze & Hutchinson, 1987

Lo sviluppo degli stadi a vita libera, è influenzato da fattori climatici come la temperatura e l'umidità. Infatti, è stato dimostrato che lo sviluppo delle larve degli SI degli equidi non avviene a valori di umidità inferiori al 15-20%. Le L1 hanno una scarsa capacità di sopravvivenza nelle feci che vengono rapidamente essiccate, viceversa se le feci subiscono un processo di essiccazione più lento si ha la sopravvivenza e lo sviluppo di una quantità di larve maggiore. È stato inoltre dimostrato che le larve di SI hanno una capacità di sopravvivenza maggiore nelle feci intatte rispetto a quelle disgregate, e che le L3 sopravvivono se poste su un vetrino ed incubate a 30°C per 65 giorni. Apparentemente quindi sembrerebbe che il processo di essiccazione piuttosto che uccidere, proteggerebbe le L3 (Nielsen et al., 2007).

Tab. 2.3 La sopravvivenza degli stadi larvali a vita libera degli strongili degli equini, esposti a differenti condizioni climatiche.

	Congelamento	Alternanza congelamento/ scongelamento	Essiccazione	Calore (a)
Uova non embrionate	++	++	<i>b</i>	++
Uova embrionate	+	-	<i>b</i>	++
L1	-	-	-	++
L2	-	-	-	++
L3	+++	+	+++	-

- Molto suscettibile; + poco resistente; ++ moderatamente resistente; +++ molto resistente. a) temperatura nel range di 30-38°C; b) No dati disponibili (Nielsen et al., 2007).

La capacità di sopravvivenza delle L3 sembra essere correlata alla presenza di granuli di grasso nelle cellule intestinali (Giovannola, 1936). Con il passare del tempo e con l'esaurirsi delle riserve energetiche, le L3 perdono la loro capacità infettante (Medica e Sukhdeo, 1997). È stato inoltre dimostrato che le L3 sopravvivono più a lungo in condizioni ambientali secche piuttosto che in ambienti umidi, in quanto, le larve non essendo attive conservano più a lungo le riserve energetiche (Mfitlodze e Hutchinson, 1987). Studi condotti in Scozia, Canada e Svezia hanno infatti dimostrato che, dopo il periodo invernale, il numero delle larve presenti sui pascoli, si riduce drasticamente a causa dell'esaurimento delle riserve energetiche (Duncan, 1974b; Slocombe et al., 1987). Lindberg (1976), di contro, ha dimostrato che il freddo non sembra essere un fattore limitante per lo sviluppo delle L3, infatti, un numero considerevole di larve infestanti eliminate sul pascolo nel periodo agosto-settembre possono sopravvivere durante l'inverno.

In riferimento ai CY, oltre 50 specie possono parassitare gli equidi. Ad oggi 10 delle 50 specie sono state descritte esclusivamente in asini e zebre (Lichtenfels et al., 2008). Tuttavia studi effettuati sui cavalli hanno dimostrato che la maggior parte dei soggetti sono parassitati da meno di 10 specie (Lichtenfels et al., 2001). Per esempio, in Francia, Ucraina, USA e Australia le specie maggiormente riscontrate sono state *Cyathostomum catinatum*, *Cylicocycclus nassatus* e *Cylicostephanus longibursatus* (Corning, 2009).

L'intensità e l'andamento della infezioni da SI è influenzata dalla localizzazione geografica e dalle differenze climatiche. Ad esempio, per quanto riguarda i CY nel cavallo nelle regioni temperate, generalmente, le larve si incistano durante i mesi più freddi per poi riemergere nel lume intestinale durante la primavera successiva, mentre nelle regioni tropicali, la maggior parte di larve incistate si riscontra durante i periodi estivi (Baudena et al., 2000). Negli asini Getachew et al. (2008a), in uno studio condotto in tre diverse zone dell'Etiopia hanno riportato una prevalenza d'infezione di SI, tra giugno e settembre, pari al 100%; risultati analoghi sono stati riscontrati da Mushi et al. (2003) che hanno riscontrato la stessa prevalenza d'infezione durante i mesi estivi (da marzo a settembre). In Europa mancano studi specifici di andamento stagionale degli SI negli asini. Come avviene nel cavallo, anche nell'asino, la stagionalità non è l'unico fattore in grado di influenzare l'intensità e l'andamento delle infezioni da SI. Anche l'età rappresenta un fattore importante che

influenza l'eliminazione delle uova. Studi condotti in Etiopia (Hiko e Menghesha, 2010; Tesfu et al., 2014) hanno riportato una maggiore prevalenza di infezione nei soggetti giovani (<4 anni di età) mentre la FEC ha mostrato valori inferiori nei soggetti con di età superiore ai 10 anni. La maggiore escrezione di uova che si rinviene nei soggetti giovani rispetto agli adulti potrebbe derivare da una non completa risposta immunitaria degli animali giovani.

Nella tabella seguente (tabella 2.4) sono riportati i risultati circa la prevalenza degli SI negli asini ottenuti in corso di indagini epidemiologiche eseguite con esami coprologici.

Tab. 2.4 Prevalenza degli SI nel corso di indagini coprologiche in asini

PAESE	N° ASINI	N° POSITIVI	(%)	BIBLIOGRAFIA
EUROPA				
Germania	46	22	48,0	Epe et al., 1993
	37	34	91,7	Beelitz et al., 1996
Grecia e Macedonia	37	27 GS	73,0 GS	Sotiraki et al., 1997
		14 PS	37,8 PS	
Italia	119	92	77,0	Giannetto et al., 2008
	72	68	93,8	Trentini et al., 2010
	91	90	98,9	Garippa et al., 2016
UK	668	668	100	Moore, 2012
	152	144	94,7	Demir et al., 1995
Turchia	110	80	72,7	Gül et al., 2003
	81	81	100	Uslu e Guçlu, 2007
	31	30	96,8	Umur e Açıci, 2009
	6	6	100	Kuzmina et al., 2007
Ucraina	33	33	100	Kuzmina e Kuzmin, 2008
AFRICA				
Burkina Faso	131	100	100	Vercruyssen et al., 1986
	215	94	43,6	Kheir e Kheir, 1981
Sudan	1200	430	35,8	Seri et al., 2004
	1200	440	36,7	
Kenya	331	280	85,0	Lewa et al., 1999
	16	14	87,5	
Nigeria	100	57	57,0	Ahmed et al., 2008
	600	470	78,3	Jajere et al., 2016
Sud Africa	24	23	95,0	Matthee et al., 2002
	20	20	100	Mushi et al., 2003
	-	-	96	Wells et al., 1998

Le principali elmintosi nell'asino

	-	-	97,1	
	-	-	95,2	
	388	360	92,8	Fikru et al., 2005
	963	963	100	Yoseph et al., 2005
	339	339	100	Ayele et al., 2006
	803	803	100	Getachew, 2006
	2385	2385	100	Getachew et al., 2008 ^a
	2935	2905	99,0	Getachew et al., 2010 ^a
	246	226	92,0	Ayele e Dinka, 2010
	167	141	71,1	Hiko e Menghessa, 2010
	324 ^a	319 ^a	98,5 ^a	
	324 ^b	324 ^b	100 ^b	Abebew et al., 2011
		101 <i>S.v.</i>	51,8 <i>S.v.</i>	
	195	24 <i>S. eq.</i>	12,3 <i>S. eq.</i>	
		60 <i>S. ed.</i>	30,8 <i>S. ed.</i>	Nuraddis et al., 2011
		185 <i>Cy</i>	94,9 <i>Cy</i>	
Etiopia	417	414	99,5	Zerihun et al., 2011
	203	168	82,7	Bogale et al., 2012
	154	109	70,8	Regassa e Yimer, 2013
	212	138	65,1	Takele e Nibret, 2013
	279	245	87,8	Mezgebu et al. 2013
	233	177	76	Tesfu et al., 2014
	384	326	84,8	Biniam e Abdisa, 2015
	200	151	75,5	Seyoum et al., 2015
	283	283	100	Sheferaw e Alemu, 2015
	384	130	33,9	Wako et al., 2016
	504	404	80,1	Zeryhun e Tsegaw, 2016
	281	276	98,2	Anteneh e Getachew, 2017
	206	184	89,3	Dibala et al., 2017
	404	210	52,0	Gebreyohans et al., 2017
	NS	138	57,2	Getahun e Kassa, 2017
	99	50	50,5	Kedir et al., 2017
	384	306	79,7	Mohamee et al., 2017
Uganda	40	+	+	Saul et al., 1997
	26	11	42,3	Nakayima et al., 2017
Ciad	1015	754	74,2	Graber M., 1970
Gambia	173	141	85,5	Mattioli et al., 1994
ASIA				
Iraq	56	32	57,1	Wannas et al., 2012
	82	45	54,8	Shrikhande et al., 2009
India	67	53	76,1	Chitra et al., 2011
	14	14	100	Dedar et al., 2011
	1794	992	55,3	Parsani et al., 2013

Le principali elmintosi nell'asino

	35	11	40,7	Sathiyamoorthy et al., 2016
Iran	60	58	96,6	Tavassoli et al., 2016
Mongolia	31	2	6,4	Painer et al., 2011
AMERICA				
Messico	177	141	79,7	Burden et al., 2010
	78	73	93,6	Valdéz-Cruz et al., 2013

GS: grandi strongili; PS: piccoli strongili; S.v.: *S. vulgaris*; S.ed: *S. edentatus*; S.eq: *S. equinus*; Cy: Cyathostominae; ^aarea di studio; ^barea controllo; NS: non specificato.

Un dato sicuramente interessante è che più della metà degli studi epidemiologici (64%) è stata condotta in Africa, principalmente in Etiopia Paese con il maggior numero di asini al mondo, riportando elevate positività con valori di prevalenza compresi tra il 90-100% in oltre il 60% degli studi.

Alti valori di prevalenza sono stati, inoltre, riscontrati in studi di necropsopia dai quali si evince chiaramente la ampia diffusione dei piccoli strongili e di *S. vulgaris*. (tabella 2.5).

Nel cavallo, prima dell'utilizzo dei moderni antielmintici, è stata dimostrata una prevalenza di *S. vulgaris*, con un range che variava dal 78-100% (Slocombe e McCraw, 1973; Drudge e Lyons, 1977; Hass, 1979); tuttavia in seguito ai ripetuti trattamenti antiparassitari e l'utilizzo dei Lattoni Macro ciclici (ivermectina e moxidectina), efficaci verso gli stadi larvali del parassita, l'incidenza di questo parassita si è ridotta (Dipietro et al., 1990; Love, 1995), negli ultimi anni anche per l'ampio utilizzo dei trattamenti selettivi un aumento di grandi strongili è stata riscontrata in alcuni paesi europei, Italia compresa (Pilo et al., 2012).

Nell'asino, invece, in cui i trattamenti antiparassitari non sono ancora molto diffusi e comunque inferiori a quelli del cavallo è possibile riscontrare infezioni parassitarie sostenute sia da grandi che da piccoli strongili (Getachew et al. 2010a). Ad esempio *Strongylus* spp., da studi coprologici condotti in Etiopia, è stato identificato in oltre il 90% dei soggetti; è stato inoltre identificato nel 100% degli asini in seguito ad esami *post mortem* (Matthews e Burden, 2013).

Abebew et al. (2011), hanno riportato una prevalenza di *S. vulgaris* pari al 100% seguito da *S. edentatus* (88,9%) e *S. equinus* (44,4%).

Elevate prevalenze di grandi strongili sono state riscontrate anche da Getahun e Kassa (2017) i quali hanno riportato una prevalenza di *S. vulgaris*, *S. edentatus* e *S. equinus* rispettivamente del 27,7%, 16,6% e 4,8%; mentre hanno rinvenuto una bassa prevalenza di *Cyathostomum* spp. pari al 7,9%.

Le principali elmintosi nell'asino

Tab. 2.5 Specie e generi di strongili gastro-intestinali (espressi in percentuale %) riscontrati in seguito ad esami coprocolturali o postmortem negli asini

	<i>S. vulgaris</i>	<i>S. edentatus</i>	<i>S. equinus</i>	<i>S. asini</i>	CY	<i>Triodontophorus</i> spp.	<i>T. axei</i>	Esame	Località
Graber (1970)	-	7,6	11,4	-	63,3	56,2	-	Post M.	Ciad
Vercruyssen et al. (1986)	100	90	60	10	NS	84%	P	Post M.	Burkina Faso
Ricci e Sabatini (1992)	P	P	P	-	-	P	-	Post. M	Italia
Ayele et al. (2006)	100	64,3			100	50	100	Coproc.	Etiopia
Umur & Açici (2009)	3,01	8,62	6,03	-	63,79	3,01	4,31	Coproc.	Turchia
Bu et al. (2009)	88,2	8,8	-	-	94,11	17,6	-	Post M	Cina
Hosseini et al. (2009)	33,3	6,6	6,6	-	100	6,6	6,6	Post M	Iran
Getachew et al. (2010a)	91,3	0,97	9,7	-	99	12,6	91,3	Coproc.	Etiopia
Morrow et al. (2011)	-	-	-	-	14,8	-	-	Post M	UK
Abebew et al. (2011)	100 ^a 100 ^b	88,9 ^a 88,9 ^b	44,4 ^a 33,3 ^b	-	100 ^a 100 ^b	44,4 ^a 55,5 ^b	33,3 ^a 33,3 ^b	Coproc.	Etiopia
Nuraddis et al. (2011)	51,8	30,8	12,3	-	-	29,7	-	Coproc.	Etiopia
Ismail et al. (2016)	60	18	22		72,3	-	30,4	Post M.	Sudan
Zerihun et al. (2011)	100	73,8	-	-	100	52,8	100	Coproc.	Etiopia
Zerihun et al. (2011)	100	100	-	-	100	-	-	Post M	Etiopia
Zeryehun et al., (2016)	100	77,7	-	-	100	-	94	Coproc.	Etiopia
Getahun & Kassa (2017)	27,7	16,6	4,8	7,9	-	1,4	8,3	Coproc.	Etiopia
Gebreyohans et al. (2017)	34,8	22,9	9,5	-	9,5	-	-	Coproc.	Etiopia

^a: Area progetto; ^b: Area controllo; -: non identificato; CY: Cyathostominae; Post M.: *post mortem*; Coproc.: coproculture; NS: non specifica; P: presente

2.2.4 Diagnosi

Il metodo più comunemente utilizzato per la diagnosi degli SI dell'asino e del cavallo, è l'esame copromicroscopico mediante *Faecal Egg Count* (FEC) cioè la conta del numero di uova per grammo di feci (UPG). Il principale svantaggio della FEC è che non è possibile evidenziare gli stadi sessualmente immaturi degli strongili quali L4 ed L5 nel lume intestinale, L3 ed L4 che si stanno sviluppando nella mucosa e le larve ipobiotiche L3 sempre a livello mucosale.

La FEC è il metodo ufficiale della WAAVP per valutare l'efficacia degli antielmintici nei cavalli, per rilevare la resistenza ai farmaci e per determinare il corretto intervallo tra i trattamenti (Duncan et al., 2002; Coles et al., 2006; Nielsen et al., 2013).

Poiché non è possibile distinguere morfologicamente le uova delle diverse specie di strongili, i campioni fecali devono essere posti in coltura per 10-14 giorni a 20-27° C per permettere lo sviluppo delle L3 che vengono poi raccolte con il *metodo Baermann*. In base al numero ed alla forma delle cellule intestinali delle L3 la maggior parte dei grandi strongili possono essere differenziati tra loro e dai CY, ma i differenti generi di CY con le coproculture non sono differenziabili tra loro.

Le caratteristiche morfologiche delle L3 dei nematodi gastrointestinali che infettano l'asino ed il cavallo sono descritte in tabella 2.6.

Tab. 2.6 Caratteristiche morfologiche della L3 degli Strongili Intestinali degli equidi

Genere	Caratteristiche morfologiche
<i>Strongyloides westeri</i>	Cuticola assente; esofago lungo quasi la metà del corpo
<i>Trichostrongylus axei</i>	Coda della cuticola corta non filamentosa
<i>Cyathostominae</i>	Lunga cuticola filamentosa 8 cellule intestinali triangolari
<i>Gyalocephalus</i>	Lunga cuticola filamentosa 12 cellule intestinali rettangolari
<i>Oesophagodontus</i>	Larva grande; lunga cuticola filamentosa 16 cellule intestinali triangolari
<i>Poteriostomum</i>	Lunga cuticola filamentosa 16 cellule intestinali rettangolari
<i>S. equinus</i>	Larva lunga e sottile; cuticola filamentosa 16 cellule intestinali rettangolari non ben definite
<i>S. vulgaris</i>	Larva grande; cuticola filamentosa; esofago corto 28-32 cellule intestinali rettangolari ben definite
<i>S. edentatus</i>	Cuticola filamentosa; 18-20 cellule intestinali rettangolari
<i>Triodontophorus</i>	Larva grande; Cuticola filamentosa; 18-20 cellule intestinali rettangolari

Adattata dal Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (M.A.F.F., 1986).

Alcuni studi hanno tuttavia dimostrato che altre metodiche diagnostiche, quali la polymerase chain reaction (PCR) rappresenta un metodo più accurato per l'identificazione di *S. vulgaris* rispetto alla coprocoltura (Nielsen et al., 2008; Bracken et al., 2012). Infatti, i valori di prevalenza ottenuti utilizzando le due metodiche sullo stesso campione di feci sono stati significativamente differenti. Inoltre, considerando la bassa sensibilità del test di *Baermann*, l'utilizzo della PCR eviterebbe la possibilità di diangosticare falsi negativi.



Fig. 2.9 Uovo di strongilo intestinale all'esame coprologico per flottazione (40x)
(Foto F. Buono)

2.3 Ordine Strongilyda: Superfamiglia Trichostrongyloidea

La superfamiglia dei Trichostrongyloidea è costituita da nematodi bursati di piccole dimensioni, che si rinvergono nel tratto alimentare dei mammiferi e degli uccelli eccezione fatta per *Dictyocaulus* spp., che si localizza a livello polmonare.

I parassiti che appartengono a questa superfamiglia che possono parassitare gli asini sono *Trichostrongylus axei* e *Dictyocaulus arnfieldi*.

2.3.1 *Trichostrongylus axei*

Il genere *Trichostrongylus* comprende nematodi a diffusione cosmopolita appartenenti al gruppo degli strongili gastrointestinali. I parassiti adulti sono molto piccoli (lunghezza 4-7 mm) e fini come capelli (spessore < 200 µm) con estremo cefalico affilato, privo di capsula buccale ed evidente poro escretore presso l'estremità cefalica.

I maschi presentano una borsa caudale a lobi laterali grandi, due spicoli corti, (100-170 µm) cranialmente bottonuti e distalmente appuntiti, il *gubernaculum* è ben sviluppato; le femmine hanno coda relativamente corta, orificio vulvare ubicato nella metà posteriore del corpo (privo di qualsiasi espansione cuticolare) ed utero contenente di norma poche uova. Queste sono caratterizzate da una forma ellissoidale (70-125 x 30-55 µm), con poli arrotondati e non facilmente distinguibili da quelle degli altri SI.

Gli stadi larvali di *T. axei* si sviluppano all'interno delle ghiandole gastriche mentre gli adulti vivono a stretto contatto con la mucosa della porzione glandolare dello stomaco degli equidi. Così come avviene nei ruminanti anche nell'asino e nel cavallo la presenza di un abbondante numero di questi parassiti determina proliferazione ed ipertrofia della mucosa gastrica. Sebbene la parassitosi da *T. axei* si possa perpetuare negli allevamenti asinini ed equini, generalmente, infezioni severe si riscontrano solo in questi soggetti che condividono il pascolo con i bovini e/o altri ruminanti (Reinemeyer e Nielsen, 2013).

2.3.1.1 Ciclo biologico

Il ciclo biologico di questo parassita è di tipo diretto e l'elemento infettante è rappresentato dalla L3. Le uova vengono espulse attraverso le feci ed in condizioni ottimali schiudono liberando una L1 che dopo qualche giorno sviluppa sino a diventare L3. Le L3 dopo essere state ingerite penetrano

nella mucosa del piccolo intestino e dopo circa una settimana avviene la muta al L4 che emergono sulla superficie della mucosa intestinale per poi mutare ad L5 e parassiti adulti.

2.3.1.2 Patogenesi e segni clinici

T. axei si rende responsabile di aree iperemiche a livello della mucosa gastrica che evolvono in infiammazioni di tipo catarrale o linfocitaria con successiva erosione dell'epitelio. Le infezioni sono spesso asintomatiche.

2.3.2 *Dictyocaulus arnfieldi*

I parassiti adulti di *D. arnfieldi* sono sottili e di colore bianco; i maschi raggiungono una lunghezza di circa 3,5 cm mentre le femmine di circa 6,5 cm. I maschi possiedono una borsa copulatoria non lobata; gli spiculi sono corti e leggermente incurvati. Questi parassiti sono inoltre provvisti di un sistema digerente e di un sistema nervoso ma non di un sistema escretore (Bowman, 2003). Le uova sono embrionate e di grandezza 80-100 x 50-60 µm. L'asino rappresenta l'ospite naturale di *D. arnfieldi* che può essere trasmesso al cavallo quando questi due animali condividono lo stesso pascolo (Rose e Hodgson, 2000). L'infezione avviene generalmente al pascolo, tuttavia, gli animali si possono infettare anche se sono stabulati nei box attraverso il foraggio e le lettiere contaminate (Junquera, 2014).

2.3.2.1 Ciclo biologico

I parassiti adulti si localizzano a livello di trachea e bronchi. Le femmine, ovovipare, depongono uova con all'interno le L1; queste, attraverso i colpi di tosse vengono portate a livello della faringe per poi essere deglutite. Una volta giunte in sede intestinale le L1 vengono espulse attraverso le feci ed in condizioni ottimali diventano infettanti (L3) in circa 3 giorni. Le L3 possono sopravvivere sino a 14 giorni quando esposte alla luce diretta del sole; mentre in alcune condizioni la loro sopravvivenza può arrivare sino ai 42 giorni (Borovkova, 1948). Le L3, una volta ingerite dall'ospite, penetrano nella mucosa intestinale, migrano ai linfonodi mesenterici e si sviluppano a L4 le quali, attraverso la via linfo-ematogena, raggiungono prima il cuore e poi i polmoni. L'ultima muta avviene entro pochi giorni nei bronchioli. Il periodo di prepatenza è di circa 2-3 mesi; tuttavia Wetzel e Enigk (1938) hanno descritto un periodo di prepatenza di 39 giorni.

2.3.2.2 *Patogenesi e segni clinici*

Sebbene questo parassita sia abbastanza comune nell'asino, raramente è associato a una sintomatologia clinica sebbene sono associati ad una elevata eliminazione di larve nelle feci; tuttavia ad un esame clinico approfondito è possibile apprezzare tachipnea e rumori polmonari aspri. Gli asini a maggior rischio di sviluppare una sintomatologia clinica in seguito ad un'elevata intensità di infezione, sono i soggetti in età geriatrica e/o immunocompromessi (Matthews e Burden, 2013).

La somministrazione di corticosteroidi o disfunzioni della porzione intermedia dell'ipofisi sembrerebbe essere, inoltre, correlata ad un'elevata carica parassitaria a livello polmonare (F.A. Burden, comunicazione personale). Nel cavallo, invece, la sintomatologia clinica può variare da lievi accessi di tosse ed un leggero incremento della frequenza respiratoria a tosse persistente con compromissione respiratoria che in alcuni casi può anche portare alla morte del soggetto. Generalmente gli accessi di tosse iniziano dal dodicesimo giorno post infezione ed i segni clinici sono maggiormente severi a partire dalla terza/quinta settimana post infezione (Round, 1976).

Infezioni patenti subcliniche possono verificarsi in tutte le specie ospiti e nell'asino possono persistere anche per più di 5 anni; negli asini non sottoposti a trattamento antiparassitario, inoltre, queste infezioni possono persistere per tutta la vita del soggetto (Matthews, 2002).

Nel cavallo il periodo di patenza è inferiore rispetto a quello dell'asino, variando dalle 6 settimane nei puledri agli 8 mesi nei cavalli adulti; tuttavia, nei cavalli caratterizzati da scadenti condizioni generali può estendersi a 21 mesi (Round, 1972).

Le principali alterazioni patologiche che si riscontrano negli equini sono influenzate da differenti fattori quali il sito in cui i parassiti si localizzano nell'apparato respiratorio, il numero delle larve infettanti ingerite, lo stato immunitario ed il BCS dell'ospite (Fraser, 1991).

2.3.2.3 *Epidemiologia*

Negli asini, che generalmente si infettano quando hanno un'età inferiore ai 2 anni, questo parassita è abbastanza comune ed è presente per tutta la vita, questo probabilmente è dovuto a reinfezioni. Proprio per questo motivo gli asini rappresentano i principali disseminatori di questo parassita; basti pensare che è possibile rinvenire sino a 1400 L1/g di feci (Round, 1972).

La disponibilità ed il trattamento antiparassitario degli asini con LM ha ridotto drasticamente la prevalenza di questa parassitosi, infatti, un recente studio ha dimostrato che solo il 4% degli asini introdotti per la prima volta al *The Donkey Sanctuary UK* sono risultati positivi all'esame coprologico (F.A. Burden, comunicazione personale).

Nella tabella che segue (tabella 2.7) sono riportati i risultati di indagini epidemiologiche condotte negli asini.

Le principali elmintosi nell'asino

Tab. 2.7 Prevalenza di *Dictyocaulus arnfieldi* nel corso di indagini coprologiche in asini

PAESE	N° ASINI	N° POSITIVI	(%)	BIBLIOGRAFIA
EUROPA				
Danimarca	176	154	87,5	Andersen e Fogh, 2010
Germania	37	6	16,2	Beelitz et al., 1996
Italia	119	29	24,3	Giannetto et al., 2008
	72	0	-	Trentini et al., 2010
	91	42	46,1	Garippa et al., 2016
Paesi Bassi	NS	NS	51,0	Boersema e Kalis, 1978
	NS	NS	0,6	Arslan e Umur, 1998
Turchia	NS	NS	14,6	Ayaz, 2003
	NS	NS	9,7	Bakirci et al., 2004
	31	3	9,67	Umur e Açıci, 2009
	AFRICA			
Etiopia	NS	NS	30,5	Legese, 1996
	NS	NS	32,8	
	388	10	2,6	Fikru et al. 2005
	331	74	22,4	Mulate, 2005
	963	+	+	Yoseph et al., 2005
	28	6	20	Ayele et al., 2006
	2385	+	+	Getachew et al., 2008a
	2935	+	+	Getachew et al., 2010a
	21 ^a	NS	22,2 ^a	Abebew et al., 2011
	21 ^b	NS	66,7 ^b	
	195	7	3,6	Nuraddis et al., 2011
	NS	18	42,8	Zerihun et al., 2011
	85	30	35,3	Solomon et al., 2012
	51	18	35,3	Feye e Bekele, 2016
	504	222	44	Zeryhun e Tsegaw, 2016
	NS	16	7,5	Getahun e Kassa, 2017
	99	5	5,0	Kedir et al., 2017
	313	57	18,2	Negasa et al., 2017
Marocco	423	202	47,8	Pandey, 1980
Sudan	1200	846	70,5	Seri et al., 2004
Uganda	26	4	15,4	Nakayima et al., 2017
ASIA				
India	82	3	3,6	Shrikhande et al., 2009
Iran	56	10	17,8	Wannas et al., 2012
AMERICA				
Kentucky	39	21	54	Lyons et al., 1985

^a: area studio; ^b: area controllo; NS: non specificato; +: positivo

2.3.2.4 Diagnosi

Le uova di *D. arnfieldi* sono di forma ellissoidale e misurano 80-100 x 50-60 μm e, generalmente, schiudono all'interno dell'intestino dell'ospite; per questo motivo le L1 (290-480 μm) (figura 2.10) possono essere rilevate nelle feci degli asini parassitati utilizzando la tecnica di Baermann (Rode e Jorgensen, 1989). Questa tecnica si basa sulla migrazione attiva da parte delle larve dal materiale fecale e la conseguente sedimentazione in acqua (Baermann, 1917). La tecnica prevede di pesare 50 grammi di feci e le larve dovrebbero essere raccolte dopo 12 ore; tuttavia è stato dimostrato che la metà delle larve può essere raccolta nel Baermann già dopo 5-6 ore (Matthews, 2002). I metodi di conservazione delle feci potrebbero influenzare la conta delle L1; per esempio, se la conservazione delle feci avviene ad una temperatura di 4°C per 48 ore, la conta delle L1 non subisce variazioni, tuttavia se le feci sono conservate tra i 16°C ed i 20°C si può avere una variazione della conta delle L1 che oscilla tra il 40-50% dopo 24 ore e assume valori prossimi all'80% dopo 48 ore (Rode e Jorgensen, 1989). Per questo motivo è necessario eseguire gli esami coprologici entro 48 ore dalla raccolta previa conservazione a temperatura di refrigerazione (+ 4° C).



Fig. 2.10 Larva di 1° stadio di *Dictyocaulus arnfeldi* e uova di SI (20x) (Foto F. Buono)

2.4 Ordine Ascaridida

L'ordine Ascaridida è costituito da due superfamiglie: Ascaridoidea e Dioctophymatoidea. La superfamiglia Ascaridoidea si suddivide a sua volta in due famiglie: Ascarididae e Anisakidae. I membri appartenenti alla superfamiglia degli Ascarididae sono caratterizzati da grosse dimensioni, da un colore biancastro e si localizzano nel piccolo intestino dei loro ospiti (figura 2.11). Sono sprovvisti di capsula buccale e la bocca è costituita da una semplice apertura circondata da tre labbra. Questi nematodi sono definiti non bursati in quanto i maschi posseggono due spiculi ma non hanno la borsa copulatoria.



Fig. 2.11 Elminta adulto di *Parascaris* spp. (Foto F. Buono)

Negli equidi l'ascaridiosi è sostenuta da *Parascaris* spp. Questi parassiti sono piuttosto grandi, infatti, i maschi possono misurare dai 15 ai 28 cm mentre le femmine possono arrivare sino a 40-50 cm di lunghezza; sono caratterizzati da un colore biancastro e da una cuticola molto dura. Le uova di questi parassiti sono di forma sferica (50-75 x 40-50 μm) e di colore marrone. Sono inoltre caratterizzati da una spessa parete sulla cui superficie è presente un rivestimento albuminoso. Gli adulti vivono nel piccolo intestino e si localizzano principalmente nel duodeno e nell'ileo prossimale, tuttavia, nelle infestazioni massive si possono riscontrare in tutta la lunghezza dell'intestino tenue (Clayton, 1986).

2.4.1 Ciclo biologico

Il ciclo biologico è di tipo diretto e subito dopo la fecondazione, che avviene nell'utero, si iniziano a formare gli strati più interni dell'uovo. Con il passaggio dell'uovo attraverso l'utero questo acquisisce un'ulteriore protezione esterna rappresentata da una sostanza gelatinosa prodotta dalle secrezioni uterine (Fairbairn, 1957). Queste uova sono generalmente ricoperte da 4 strati (Rogers, 1956): 1) strato lipidico esterno; 2) strato chitinoso avente uno spessore di 3-4 micron; 3) strato vitellino; 4) strato mammellonato composto da mucopolisaccaridi e proteine di origine uterina (Wharton, 1980).

Il guscio esterno conferisce una notevole resistenza alle uova che possono rimanere vitali nell'ambiente esterno per un lungo periodo di tempo.

Le femmine sono molto prolifiche e possono produrre sino a 200.000 uova al giorno (Pilliner e Davie, 1996). Queste sono espulse nell'ambiente esterno attraverso le feci e in condizioni ambientali favorevoli (25-35°C) raggiungono lo stadio infettante in 10-14 giorni (Southwood et al., 1998). A 15°C lo sviluppo dello stadio infettante avviene più lentamente mentre a 0°C le uova non maturano ma restano vitali per un tempo indefinito (Fairbairn, 1957). L'elemento infettante è rappresentato dall'uovo con all'interno la L2. In seguito all'ingestione dell'elemento infettante ha inizio la fase parassitaria del ciclo biologico. Le uova perdono gli strati protettivi successivamente al passaggio nell'ambiente acido dello stomaco e basico dell'intestino dove risiedono per circa 24 ore. Successivamente le larve attraverso il sistema linfatico e circolatorio dall'intestino sono trasportate passivamente al fegato. Questi parassiti, per potersi sviluppare ad adulti, sessualmente maturi, compiono una tipica migrazione entero-epato-polmonare (Srihakim e Swerczek, 1978). Dopo 7 giorni dall'infezione la maggior parte delle larve si riscontra a livello epatico (Clayton e Duncan, 1979), mentre intorno al quattordicesimo giorno, la maggior parte delle larve migra nel parenchima polmonare e le vie aeree (Lyons et al., 1976). Tra il diciassettesimo ed il ventitreesimo giorno post-infezione la maggior parte delle larve mutate a L3 risalgono la trachea per poi essere deglutite e migrare nuovamente al piccolo intestino dove si rinvergono gli elminti adulti 90-110 giorni dopo l'ingestione dell'uovo larvato. Studi sperimentali hanno dimostrato che il periodo di prepatenza può variare da 72 a 100 giorni (Lyons et al., 1976; Clayton e Duncan, 1977, 1979), tuttavia in infezioni naturali i puledri iniziano a espellere uova di *P. equorum* tra i 77 ed i 98 giorni di vita (Russell, 1948; Todd e Doherty,

1951). I puledri possono eliminare grandi quantità di uova; un puledro infettato sperimentalmente ha eliminato circa 50 milioni di uova al giorno (Clayton e Duncan, 1979).

A differenza di quanto avviene per altre specie di ascaridi come ad esempio *Toxocara canis* nel cane la cui trasmissione può avvenire anche per via transplacentare o attraverso il latte (Swerczek et al., 1971), *P. equorum* non si trasmette per via verticale e non sono state identificate larve dal colostro o dal latte (Clayton, 1986).

2.4.2 Patogenesi e segni clinici

La sintomatologia clinica causata da questa parassitosi generalmente è correlata alla carica infettante (Peregrine et al., 2014). Le larve non sembrerebbero causare notevoli danni al livello intestinale, tuttavia, le lunghe migrazioni che le larve compiono a livello epatico e polmonare provocano seri danni prima di diventare parassiti adulti in sede intestinale.

A livello epatico si evidenziano macroscopicamente lesioni fibrotiche focali biancastre al di sotto della glissoniana (Brown e Clayton, 1979). Ulteriori lesioni epatiche sono: petecchie emorragiche, edemi e focolai necrotici (Srihakim e Swerczek, 1978). È stato inoltre riscontrato che puledri sottoposti a continue inoculazioni di un piccolo numero di uova infettanti di ascaridi subiscono cambiamenti macroscopici nell'architettura epatica (Brown e Clayton, 1979). Questa tesi è stata inoltre confermata da Nielsen (2015a) nel corso di esami necroscopici in puledri che non sono stati sottoposti a trattamenti antiparassitari.

A livello polmonare è possibile rinvenire edemi, emorragie diffuse e focolai necrotici associati alla migrazione delle larve. In corso di infezione sperimentale, a livello dei lobi polmonari, è stata evidenziata la presenza di noduli subpleurici di circa 5 mm di diametro; in alcuni casi si sono osservati anche processi di calcificazione (Clayton e Duncan, 1977).

I polmoni, inoltre, possono presentare aree di polmonite che appaiono rosse e collassate. Oltre alle lesioni associate alla migrazione delle larve (c.d. *microascaridiosi*), la conseguenza più grave che si può verificare in corso di infezione da ascaridi è rappresentata dall'ostruzione intestinale (figura 2.12) da parte dei pre-adulti (L5) ed adulti che può anche portare a morte i soggetti (c.d. *macroascaridiosi*) (Ryu et al., 2004). Come riportato in una recente review da Nielsen (2015a), la maggior parte dei casi di impaccamento da ascardi si verifica durante l'autunno e molto spesso i cavalli erano stati trattati con un antiparassitario nelle 24 ore precedenti

l'insorgenza dei sintomi. È stato quindi ipotizzato che il trattamento antielmintico potrebbe rappresentare un fattore di rischio per l'ostruzione da ascaridi (Cribb et al., 2006).

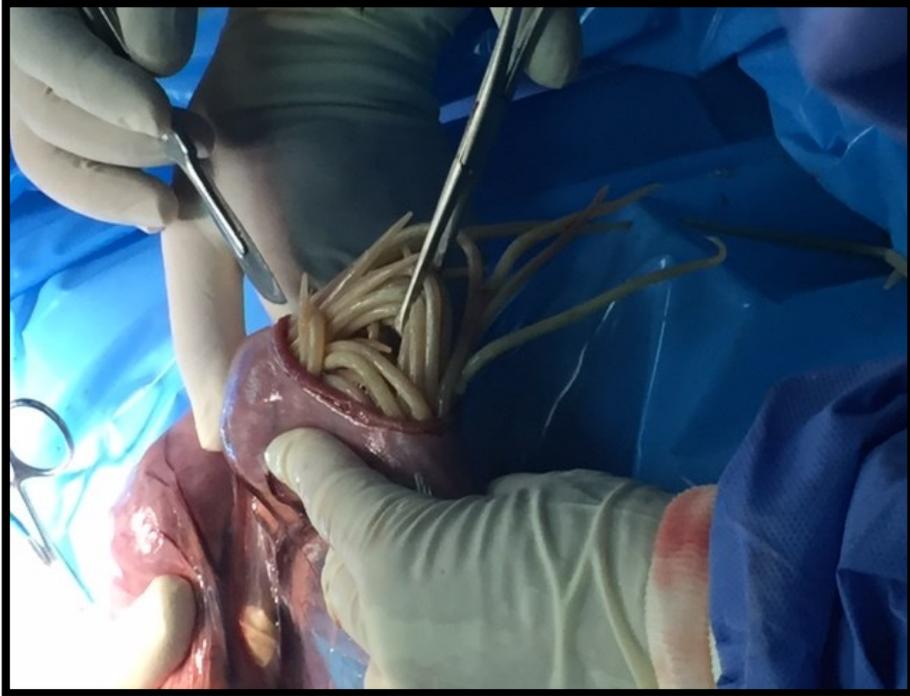


Fig. 2.12 Ostruzione intestinale da ascaridi in puledro in seguito a trattamento antielmintico (Foto F. Buono)

La sintomatologia clinica ascrivibile all'infestazione da ascaridi include: tosse, disturbi respiratori (durante la fase di migrazione-microascaridiosi) (Srihakim e Swerczeck, 1978), depressione, letargia e perdita di peso a causa della presenza dei parassiti a livello intestinale che competono con l'ospite per l'assunzione dei nutrienti (Nielsen, 2015a). Uno studio recente, tuttavia, non ha riscontrato una associazione tra la carica di ascaridi presenti nell'intestino e lo stato di nutrizione dei soggetti colpiti (Bellaw, J.L., Pagan, J., Cadell, S., Pethean, E., Donecker, J.M., Nielsen, M.K., dati non pubblicati). Questo dato suggerisce che un buon management aziendale può compensare gli effetti negativi del parassitismo. Questa condizione tuttavia è differente nei cavalli rispetto agli asini in cui, spesso, il management non è ottimale e quindi gli ascaridi possono contribuire all'aggravamento dello stato di salute degli animali (Getachew et al., 2008b; 2010a).

2.4.3 Epidemiologia

Negli equini l'ascaridiosi è stata sempre associata ad una sola specie *Parascaris equorum*, tuttavia in letteratura sono presenti alcuni lavori che dimostrano la presenza anche di una seconda specie: *Parascaris univalens*. Entrambi i parassiti sono stati descritti più di 130 anni fa (van Beneden, 1883). Theodor Boveri (1887) tramite studi genetici ha dimostrato la presenza di due specie differenti soprannominate *Ascaris megalcephala univalens* e *Ascaris megalcephala bivalens* che come suggerisce il nome sono caratterizzati dall'avere, rispettivamente, una o due coppie di cromosomi. Da allora è stato comunemente accettato che l'ascaridiosi negli equidi è sostenuta da due specie di ascaridi morfologicamente indistinguibili tra loro (Biocca et al., 1978). Ci sono pochi studi in letteratura relativi alla prevalenza e alla distribuzione di queste due specie di elminti; l'unico dato disponibile in letteratura riguarda uno studio condotto in Italia negli anni '70, che ha dimostrato una prevalenza del 93% (2081/2238) di *P. univalens* ed il restante 7% (157/2238) di *P. equorum* o ibridi delle due specie (Bullini et al., 1978). Successivamente, sui campioni di feci raccolti in Italia, sono stati effettuati diversi studi citologici al fine di differenziare queste due specie (Goday e Pimpinelli, 1984; 1986; 1989); inoltre studi condotti in Spagna hanno dimostrato la sola presenza di *P. univalens* (Esteban et al., 1995). In seguito a queste osservazioni è possibile affermare che *P. univalens* potrebbe rappresentare la principale specie di ascaride che si riscontra negli equidi mentre *P. equorum* risulterebbe essere più raro. Le infezioni da ascaridi assumono una distribuzione cosmopolita (Fritzen et al., 2010) e nei puledri la prevalenza può variare dal 31 al 61% mentre nei cavalli al di sopra dell'anno di età generalmente la prevalenza non supera il 25% (Nielsen, 2015a). Tuttavia, recenti studi hanno dimostrato che la prevalenza di infezioni patenti di *P. equorum* in puledri al di sotto dell'anno di età varia dallo 0% all'80% (Laugier et al., 2012; Relf et al., 2013; Armstrong et al., 2014; Lyons e Tolliver, 2014). Proprio per questo motivo questa parassitosi la si riscontra con una maggiore facilità negli allevamenti in cui sono presenti molti puledri. Di contro, la prevalenza nei cavalli al di sopra dell'anno di vita è del tutto trascurabile se non completamente assente (Relf et al., 2013). Questa differente prevalenza legata all'età dei soggetti è da attribuire alla risposta immunitaria che si instaura indipendentemente dall'esposizione al parassita a partire dai sei mesi di età (Dipietro e Todd, 1988). Studi recenti hanno dimostrato che l'eliminazione delle uova di ascaridi raggiungerebbe

un picco intorno ai 4-5 mesi di età per poi subire una notevole diminuzione fino anche ad azzerarsi intorno ai 6 mesi e che la conta dei parassiti a livello intestinale assumerebbe un andamento simile (Donoghue et al., 2015). Tuttavia un ulteriore studio ha dimostrato un andamento bifasico della parassitosi in puledri non sottoposti a trattamento antiparassitario, con un secondo picco meno intenso intorno agli 8-10 mesi di età (Donoghue et al., 2015). Un'ulteriore indagine condotta su puledri fino ai 16 mesi di età ha evidenziato una bassa prevalenza di infezione, se non addirittura l'assenza di parassiti, dopo i 7 mesi di vita (Nielsen, 2015a); per cui questo andamento bifasico dell'infezione sembrerebbe essere poco comune. L'età rappresenterebbe quindi un fattore di rischio correlato all'infezione da ascaridi; infatti uno studio condotto in Germania, in cavalli di differente età, ha dimostrato che solo puledri e *yearlings* erano parassitati (Fritzen et al., 2010). Hinney et al. (2011), sempre in Germania, hanno dimostrato, in seguito ad esami coprologici, che il 33% dei puledri ed il 6% degli *yearling*, era positivo agli ascaridi. Una ulteriore indagine epidemiologica condotta in Spagna ha evidenziato una prevalenza di infezioni pari al 22% in cavalli al di sotto dei 3 anni di età (Francisco et al., 2009). In Italia sono riportati valori più bassi 6,9% (Zidda et al., 2016) e 8,3% (Pacifico et al., 2016) in due ampie indagini epidemiologiche riguardanti puledri e cavalli adulti.

È interessante notare che in asini e cavalli allevati in ambienti tropicali, è spesso possibile riscontrare una alta prevalenza di questa parassitosi (Vercruysse et al., 1986; Getachew et al., 2008b, 2010a; Lem et al., 2012) la quale non sembrerebbe avere una differente distribuzione negli asini di differenti classi di età (Getachew et al., 2008b). Questa osservazione, tuttavia sembrerebbe essere determinata principalmente ad una compromessa risposta immunitaria degli asini per uno stato nutrizionale non soddisfacente (Nielsen, 2015a).

Così come nel cavallo anche nell'asino le infezioni parassitarie da ascaridi assumono una distribuzione cosmopolita (tabella 2.8).

Le principali elmintosi nell'asino

Tab. 2.8 Prevalenza di *Parascaris* spp. nel corso di indagini coprologiche in asini

PAESE	N° ASINI	N° POSITIVI	(%)	BIBLIOGRAFIA
EUROPA				
Germania	106	3	2,8	Goethe e Heil, 1984
	46	1	2,2	Epe et al., 1993
	37	+	+	Beelitz et al., 1996
Italia	119	11	9,2	Giannetto et al., 2008
	72	13	18,0	Trentini et al., 2010
	91	14	15,4	Garippa et al., 2016
Turchia	81	8	9,8	Uslu e Guçlu, 2007
	31	7	22,5	Umur e Açici, 2009
AFRICA				
Ciad	1015	266	26,2	Graber M., 1970
Burkina Faso	131	100	100	Vercruyssen et al., 1986
Gambia	173	16	9,2	Mattioli et al., 1994
	388	66	17,1	Fikru et al., 2005
Etiopia	963	+	+	Yoseph et al., 2005
	339	170	50,0	Ayele et al., 2006
	803	410	51,1	Gatechew et al., 2008b
	2935	1497	51,0	Getachew et al., 2010 ^o
	324 ^a	74 ^a	22,8 ^a	Abebew et al., 2011
	324 ^b	161 ^b	49,7 ^b	
	195	103	52,8	Nuraddis et al., 2011
	417	222	53,2	Zerihun et al., 2011
	279	118	42,3	Mezgebu et al., 2013
	154	16	10,4	Regassa e Yimer, 2013
	233	61	26,2	Tesfu et al., 2014
	384	79	20,5	Biniam e Abdisa, 2015
	200	60	30,0	Seyoum et al., 2015
	283	29	10,2	Sheferaw e Alemu, 2015
	504	211	41,8	Zeryhun e Tsegaw, 2016
	384	53	13,8	Wako et al., 2016
281	60	21,3	Anteneh e Getachew, 2017	
404	26	6,4	Gebreyohans et al., 2017	
NS	27	11,2	Getahun e Kassa, 2017	
99	19	19,2	Kedir et al., 2017	
384	172	44,8	Mohamee et al., 2017	
Sudan	1200	128	10,7	Seri et al., 2004
Sud Africa	NS	NS	9,6	Wells et al., 1998
	NS	NS	0,6	
	NS	NS	33,9	
Uganda	40	+	+	Saul et al., 1997
ASIA				
India	83	7	8,4	Kotwal et al., 2000

Le principali elmintosi nell'asino

	82	24	29,3	Shrikhande et al., 2009
	67	10	14,9	Chitra et al., 2011
	1794	427	23,8	Parsani et al., 2013
	35	20	74	Sathiyamoorthy et al., 2016
Iraq	56	18	32,1	Wannas et al., 2012

^aarea di studio; ^barea controllo; +: positivo; NS: non specificato

Così come per gli SI anche gli studi epidemiologici sulle infezioni sostenute da *Parascaris* spp. sono stati condotti principalmente in Africa (68,4%) con pervalenze superiori al 40% in quasi la metà delle indagini. È da notare, invece negli studi condotti in Europa le positività sono più basse risultando quasi sempre al di sotto del 20%; questo potrebbe essere associato al diverso management degli asini che in Europa sono sicuramente meglio gestiti da un punto di vista sanitario.

2.4.4 Diagnosi

La diagnosi si basa sulla presenza delle uova nelle feci (fig. 2.13) attraverso esami copromicroscopici per flottazione. In caso di quadro clinico compatibile, ma in assenza di copropositività, è possibile sospettare un'infezione non ancora patente. Infatti, uno studio retrospettivo sulla conta di uova di *Parascaris* spp., ha rinvenuto valori predittivi negativi e positivi pari rispettivamente a 0,95 e 0,66; ciò significa che una FEC positiva è strettamente correlata alla presenza d'infezione mentre un valore negativo non sempre può escludere l'assenza del parassita (Nielsen et al., 2010).



Fig. 2.13 Uovo di *Parascaris* spp. all'esame coprologico per flottazione (40x) (Foto F. Buono)

Bisognerebbe inoltre considerare che la coprofagia è un fenomeno abbastanza frequente nei puledri e questo potrebbe dar luogo a falsi positivi (Nielsen, 2015a); tuttavia Nielsen et al. (2010) hanno dimostrato che questa evenienza è trascurabile considerato che solo il 5% dei campioni testati rappresentava un falso positivo; viceversa circa un terzo dei campioni analizzati risultava falso negativo. Alcune di queste false negatività erano correlate alla prepatenza, tuttavia è stato anche riportato che nei puledri e nei giovani cavalli la frequenza dell'escrezione delle uova nelle feci può presentare un andamento intermittente (Nielsen, 2015a). Un altro importante fattore da dover considerare è che non esiste una correlazione lineare tra la carica parassitaria e il numero delle uova espulse attraverso le feci (Nielsen et al., 2010). In altre parole, non sempre un elevato numero di uova riscontrato alla Faecal Egg Count (FEC) è correlato ad una alta carica di parassiti adulti a livello intestinale; per cui la FEC ha un buon potenziale diagnostico di tipo qualitativo (positivo vs negativo) in quanto il numero di uova per grammo di feci (UPG) per gli ascaridi non sempre è associato ad una diretta correlazione lineare con il

numero di parassiti adulti (Nielsen et al., 2010; Nielsen, 2015a). Il rischio di ostruzione intestinale in seguito ad un trattamento antiparassitario ha tuttavia evidenziato la necessità di valutare il numero di elminti presenti a livello intestinale. In aggiunta alla FEC per stimare l'intensità dell'infezione, è stata recentemente testata la possibilità di valutare, con un esame ecografico transaddominale, il numero di parassiti presenti a livello intestinale (Nielsen et al., 2015, 2016b).

Negli equidi i tentativi di determinare le risposte sierologiche associate ad una infezione da *Parascaris* spp. non hanno ancora portato a risultati soddisfacenti (Vlamick et al., 2012). La diagnosi sierologica viene considerata poco applicabile in quanto la contaminazione da uova di ascaridi risulta essere praticamente ubiquitaria negli ambienti frequentati dai cavalli, per cui il saggio qualitativo sierologico potrebbe avere uno scarso, se non nullo, valore diagnostico. Inoltre nei puledri risulta difficile rinvenire un soggetto che non sia mai venuto a contatto con il parassita che possa fungere da controllo negativo, considerato che potenzialmente tutti i puledri possono essere esposti al parassita e che gli anticorpi passano dalla madre al feto attraverso il colostro (Burk et al., 2014).

2.5 Ordine Oxyurida

All'ordine Oxyruida appartiene la superfamiglia Oxyuroidea la quale a sua volta è suddivisa nelle seguenti famiglie: Oxyruidae, Cosmocercidae, Aspidoderidae e Pharyngodonidae.

Negli asini e nei cavalli l'infestazione da ossiuri è sostenuta da *Oxyuris equi* il quale, è caratterizzato dall'aver una distribuzione cosmopolita (Urqhart et al., 1996). Questo parassita si localizza nell'ultimo tratto del grosso intestino e nel retto. Gli adulti non sono attaccati alla mucosa e sono associati ad irritazione durante la ovodeposizione. Le femmine rilasciano le uova nell'area perianale in un fluido ricco di proteine ed appiccicoso.

Gli stadi adulti sono di colore bianco-giallo opaco e con una coda molto lunga che diminuisce di spessore gradatamente (per questo motivo definiti anche vermi a spillo) (figura 2.14). Le femmine adulte raggiungono una lunghezza di circa 10-15 cm e presentano la vulva in posizione anteriore, i maschi, invece, raggiungono una lunghezza di circa 1 cm. Le uova assumono una forma ovoidale (45 x 90 µm), sono di colore giallastro e caratterizzate da un polo mucoide ad una delle due estremità.



Fig. 2.14 *Oxyuris equi* raccolti durante una esplorazione rettale (Foto F. Buono)

Probstmayria vivipara, è un secondo ossiuride degli equidi meno conosciuto descritto per la prima volta da un autore tedesco, Probstmayr (1865), con il nome di *Oxyuris vivipara*. Una descrizione accurata è stata poi eseguita da Ranson nel 1907. Sono piccoli parassiti trasparenti la cui lunghezza oscilla tra i 2 ed i 3 mm (2,7 mm i maschi e 2 mm le femmine) ed il diametro diminuisce verso entrambe le estremità. Larve ed adulti possono essere repertate nelle feci. È un elminta a diffusione cosmopolita.

2.5.1 Ciclo biologico

Il ciclo biologico di *O. equi* inizia quando un equide entra in contatto con l'elemento infettante, rappresentato da un uovo contenente al suo interno la larva di terzo stadio. Una volta ingerite, le uova schiudono a livello intestinale e la L3 invade le cripte del Lieberkühn a livello del cieco e del colon ventrale, dopo 3-11 giorni questa riemerge nel lume intestinale come L4 ed in circa 50 giorni muta ad L5 la quale a sua volta maturerà in parassita adulto, sessualmente maturo, in circa 100 giorni (Enigk, 1949). Generalmente i parassiti adulti si rinvencono nel colon dorsale di destra, tuttavia, se la carica infettante è molto elevata si possono ritrovare nel tratto prossimale del grosso intestino (Enigk, 1949). Le femmine gravide a loro volta migrano nel retto per poi protrudere dall'ano e depositare dalle 8.000 alle 60.000 uova, avvolte in un fluido di natura proteica, nella regione perianale. Questo fluido, a contatto con l'aria tende a seccare e apparire come un film opaco che può assumere una differente colorazione (bianco, crema, giallo, arancio chiaro o verde) (Reinemeyer e Nielsen, 2014) (figura 2.15).

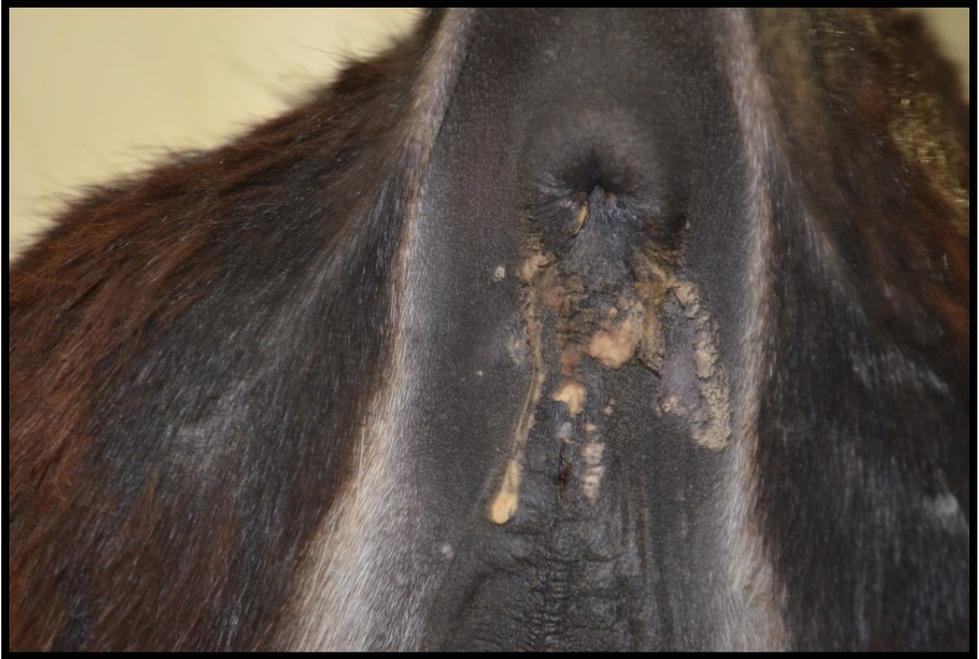


Fig. 2.15 *Oxyruis equi* - aggregati di uova in fluidi mucosi nella regione perianale di un asino (Foto F. Buono)

La deposizione delle uova nella regione perianale rappresenta un enorme vantaggio evolutivo, infatti, per lo sviluppo a stadio infettante, le uova di molti nematodi richiedono un adeguato tasso di umidità e temperatura, ossigeno e la protezione dalle radiazioni solari. Il microclima che si crea sotto la coda e nella regione perianale di asini e cavalli, risponde pienamente a tutte queste condizioni. La successiva dispersione delle uova nell'ambiente è avvantaggiata dalla reazione irritativa locale che porta l'animale a grattarsi contro superfici (muri, steccati, abbeveratoi e mangiatoie). Le uova diventano infettanti in circa 3-55 giorni. Il periodo di prepatenza varia dai 4,5 ai 5 mesi (Enigk, 1949; Hasslinger, 1990).

Il ciclo biologico di *P. vivipara* differisce da quello di *O. equi* in quanto è completamente endogeno, con tutti gli stadi che si sviluppano nel cieco e nel colon degli equidi, asini compresi. Le femmine sono vivipare e producono larve delle dimensioni degli adulti (Ranson, 1907). L'infezione ad un nuovo ospite si crede avvenga con la contaminazione di alimenti ed acqua di abbeverata con le larve presenti nelle feci (Soulsby, 1965a) e forse con la coprofagia (Smith, 1979). Babaeva (1975) riporta l'infezione

sperimentale in 10 puledri di asini somministrando loro larve infettanti di *P. vivipara* tre volte al giorno per nove giorni.

2.5.2 Patogenesi e segni clinici

In letteratura è riportato che i parassiti adulti di *O. equi* non svolgano un ruolo importante nella patogenesi, se non quella associata all'azione irritativa della deposizione delle uova, mentre l'erosione superficiale e l'irritazione della mucosa intestinale è dovuta alle abitudini alimentari delle L4 (Reinemeyer e Nielsen, 2014). Enigk (1949) ha riportato edema ed eritema della parete del colon ventrale e del cieco in puledri infettati da *O. equi*. Inoltre ha descritto linfocitosi e scarse condizioni generali come conseguenza della parassitosi, ascrivibili alla presenza delle L3 e delle L4 a livello intestinale. L'irritazione della regione perianale, inoltre, sembrerebbe essere attribuita agli aggregati di uova deposti dalle femmine, tuttavia, non è ancora ben chiaro se sia dovuta al solo essiccamento e contrazione del muco proteico a livello cutaneo o se siano coinvolte ulteriori sostanze irritanti o se entrino in gioco risposte immunologiche da parte dell'ospite. Probabilmente quest'ultima ipotesi sembrerebbe essere la più accreditata in quanto Reinemeyer e Nielsen (2014) e Wolf et al. (2014) hanno riportato assenza di prurito ed irritazione locale perianale in cavalli con una carica parassitaria molto elevata. Nell'asino tuttavia l'azione irritativa locale non sembrerebbe essere così frequente come nel cavallo, per questo gli asini non si grattano e non presentano lesioni a livello della coda così come nei cavalli (F.A. Burden, comunicazione personale).

2.5.3 Epidemiologia

Le infezioni da ossiuri generalmente sono sostenute da un numero limitato di elminti adulti nell'intestino dell'ospite. Diversi studi necroscopici hanno dimostrato che la carica infettante in cavalli non sottoposti a trattamento non superava i 200 elminti adulti (Lyons et al., 2006, 2007; Pereira e Vianna 2006; Slivinska et al., 2009), di contro il numero delle L4 può anche superare le 10.000 unità in un singolo ospite (Lyons et al., 2007).

È interessante notare che generalmente il rapporto femmine:maschi in un equide può essere di 10:1 (Reinemeyer e Nielsen, 2014). Come avviene anche per gli ascaridi, le infezioni da ossiuri si rinvencono principalmente nei puledri e nei cavalli giovani rispetto agli animali anziani (Drudge e Lyons, 1983; Lyons et al., 2006).

Indagini epidemiologiche sull'asino riportano prevalenze d'infezione da parte degli ossiuri piuttosto basse (inferiore al 10%) (Ayele et al., 2006; Getachew et al., 2010; Abebew et al., 2011). In Italia Trentini et al (2010) riportano valori del 9,7% in una azienda biologica dell'Emilia Romagna e in asini dell'Asinara Garippa et al. (2016) riportano valori del 2,2% (tabella 2.11). Uno studio condotto in Etiopia riporta, tuttavia, un valore di prevalenza maggiore (31,8%), tuttavia questa condizione, così come riportato dagli autori, potrebbe essere giustificata da una condizione climatica più favorevole allo sviluppo del parassita (Nuraddis et al., 2011). Hosseini et al. (2009), in Iran, hanno inoltre riportato la presenza di *P. vivipara* con una prevalenza del 20%. Questo parassita è stato inoltre riportato da Umur ed Açici (2009) in uno dei 26 muli esaminati (3,84%). Nell'asino in Turchia questo ossiuro è stato riportato con una prevalenza variabile da 0,6-80% con studi di neroscopia (Burgu et al., 1995; Demir et al., 1995; Arslan e Umur, 1998). In Italia il parassita è riportato in una indagine necroscopica condotta da Ricci e Sabatini (1992).

Le principali elmintosi nell'asino

Tab. 2.9. Prevalenza di *Oxyuris equi* nel corso di indagini coprologiche in asini

PAESE	N° ASINI	N° POSITIVI	(%)	BIBLIOGRAFIA	
EUROPA					
Italia	119	ND	-	Giannetto et al., 2008	
	72	7	9,7	Trentini et al., 2010	
	91	2	2,2	Garippa et al., 2016	
Turchia	81	1	1,23	Uslu e Guçlu, 2007	
	31	2	6,45	Umur and Açici, 2009	
AFRICA					
Ciad	1015	93	9,1	Graber, 1970	
	388	8	2,1	Fikru et al., 2005	
	963	+	+	Yoseph et al., 2005	
	339	10	3	Ayele et al., 2006	
	2385	+	+	Getachew et al., 2008a	
	2935	58	2	Getachew et al., 2010a	
	324 ^a	15 ^a	4,60 ^a	Abebew et al., 2011	
	324 ^b	21 ^b	6,50 ^b		
	Etiopia	195	62	31,8	Nuraddis et al., 2011
		279	12	4,3	Mezgebu et al. 2013
154		7	4,5	Regassa e Yimer, 2013	
384		59	15,4	Biniam e Abdisa, 2015	
200		12	6,0	Seyoum et al., 2015	
283		6	2,1	Sheferaw e Alemu, 2015	
384		20	5,2	Wako et al., 2016	
NS		8	6,5	Getahun and Kassa, 2017	
99		6	6,0	Kedir et al., 2017	
384		41	10,7	Mohamee et al., 2017	
Gambia	173	1	0,6	Mattioli et al., 1994	
Sud Africa	NS	NS	0,8	Wells et al., 1998	
	NS	NS	0,6		
	NS	NS	17,7		
ASIA					
India	82	7	8,53	Shrikhande et al., 2009	
	35	7	25,9	Sathiyamoorthy et al., 2016	
Iraq	56	10	17,85	Wannas et al., 2012	

^aarea di studio; ^barea controllo; NS: non specificato

2.5.4 Diagnosi

Un sospetto clinico fondato si può basare sulla presenza del materiale mucoso contenente le uova a livello del perineo (figura 2.15). A volte è possibile ritrovare elminti adulti nelle feci (figura 2.14). La diagnosi delle

uova di *O. equi* in feci sottoposte all'esame coprologico è spesso associata a falsi negativi; un campione fecale è più probabile che sia positivo per le uova di ossiuri se viene raccolto direttamente dal retto piuttosto che dal pavimento della stalla. L'atto della esplorazione rettale spesso trasferisce le uova dalla zona perianale sul guanto e quindi sulla superficie del campione fecale (figura 2.16).



Fig. 2.16 Uovo di *Oxyuris equi* all'esame coprologico per flottazione (40x) (Foto F. Buono)

Sebbene spesso non sia possibile riscontrare il muco proteico nella regione perianale, le uova di questi parassiti possono essere adese alla mucosa e proprio per questo motivo possono essere raccolte facendo aderire dello scotch nei pressi del perineo (scotch test). Lo scotch così ottenuto sarà poi applicato ad un vetrino portaoggetti e letto al microscopio.

2.6 Ordine Rhabditida

L'ordine Rhabditida è composto da un'unica superfamiglia la quale a sua volta si suddivide nelle famiglie Strongyloididae, Panagrolamidae, Rhabdidae, Rhabdiasidae.

Appartiene alla famiglia Strongyloididae, *Strongyloides* spp. che infetta un vasto range di animali domestici (uomo compreso) ed in genere c'è una specificità d'ospite. *Strongyloides westeri* è parassita cosmopolita di piccole dimensioni (3-8 mm) che si localizza a livello del piccolo intestino di cavalli ed asini. Caratteristica di questo parassita è che solo le femmine sono responsabili della fase parassitaria e le uova sono prodotte tramite il processo di partenogenesi (Thamsborg et al., 2017).

2.6.1 Ciclo biologico

Così come le altre specie di *Strongyloides*, anche *S. westeri* è caratterizzato da un ciclo biologico a vita libera, in cui il maschio e la femmina si riproducono sessualmente e un ciclo in cui le femmine si ritrovano come parassiti nell'intestino dell'ospite e si riproducono per partenogenesi.

L'infezione generalmente avviene in seguito ad assunzione della L3 per via percutanea o orale. La L3 dopo una migrazione per via linfatica o emato-tracheale, si porta nella porzione prossimale del piccolo intestino dove sviluppa a parassita adulto (Mansfield et al., 1995).

Un'altra importante fonte d'infezione per i puledri, nei primi giorni di vita, è rappresentata dalla trasmissione delle larve attraverso il latte materno, o più precisamente il colostro; infatti, le fattrici possono essere portatrici di larve inibite a livello sottocutaneo, che si riattivano in prossimità del parto e migrano a livello del parenchima mammario. La trasmissione, in seguito a riattivazione delle larve inibite, attraverso il colostro è tipica in tutte le specie ospiti (Shoop et al., 2002).

Si sa poco circa il tempo escrezione di *S. westeri* nel latte: in uno studio condotto su fattrici infettate sperimentalmente una sola fattrice di pony Shetland ha presentato larve nel latte ai giorni 10, 24 e 32 post partum mentre tutte le altre fattrici (n° 9) oggetto di studio non hanno presentato escrezione nel latte. Tuttavia, in altre giumente in esame, le larve non sono state riscontrate nel latte, anche se i loro puledri sono risultati infetti 13 e 16 giorni post-partum. Le condizioni sperimentali in questo studio impedivano la trasmissione ambientale, per cui le infezioni erano verosimilmente lattogene e la mancanza di larve rilevate nel latte delle

cavalle era probabilmente dovuta alla sensibilità relativamente bassa del test utilizzato (Mirck, 1977). Nello stesso studio, in 10 puledri nati da madri parassitate ed allevati con allattamento artificiale non si sono sviluppate infezioni da *S. westeri*; questo indica che la trasmissione verticale attraverso la placenta non si verifica (Mirck, 1977).

Il periodo di prepatenza varia dai 10 ai 14 giorni mentre il periodo di patenza ha un range di 43-83 giorni (Mirck e Franken, 1978). Le infezioni patenti si riscontrano esclusivamente nei puledri in quanto l'immunità nei confronti di questo parassita si sviluppa completamente verso i 5 mesi di età (Reinemeyer e Nielsen, 2013).

2.6.2 Patogenesi e segni clinici

La maggior parte delle infezioni sostenute da *S. westeri* nei puledri è asintomatica. La sintomatologia clinica si evidenzia esclusivamente nei puledri sino a 7 settimane di vita (Hiepe et al., 1975) e solo quando è presente una carica infettante elevata (> 2.000 UPG) (Netherwood et al., 1996). I segni clinici sono caratterizzati da diarrea, debolezza, perdita di peso ed in alcuni casi disturbi respiratori.

L'infezione da parte di un cospicuo numero di larve provoca infiammazione, edema ed erosione della mucosa intestinale (Brown et al., 1997); inoltre quando le larve sono assunte attraverso la via percutanea o orale e si portano in sede polmonare possono provocare processi flogistici ed emorragici. La diagnosi differenziale da *S. westeri* include la diarrea da calore dei puledri che generalmente occorre durante la seconda settimana di vita (Reinemeyer e Nielsen, 2013).

I trattamenti antiparassitari dovrebbero essere consigliati esclusivamente per quei puledri che presentano una sintomatologia clinica associata a copropositività per *S. westeri*. Proprio per questo motivo i trattamenti antiparassitari nei puledri di 1-2 settimane di vita al fine di prevenire questa parassitosi sono sconsigliati (Reinemeyer e Nielsen, 2013). Inoltre, un eventuale trattamento durante questo periodo di vita potrebbe contribuire allo sviluppo dell'antielmintico resistenza a *Parascaris* spp. Il trattamento della fattrice con un lattone macrociclico (ivermectina o moxidectina), nel corso dell'ultimo mese di gestazione, potrebbe prevenire la trasmissione di *S. westeri* attraverso il latte.

2.6.3 Epidemiologia

Negli cavalli ed asini la parassitosi è sostenuta da *Strongyloides westeri* che generalmente infetta solo i puledri sino a 15-20 giorni di vita. La prevalenza di questa parassitosi è piuttosto bassa, infatti, nel cavallo è stata riscontrata in meno del 10% dei casi (Mfitlodze e Hutchinson, 1989; Lyons et al., 1993; Gawor, 1995; Teixeira et al., 2014). Inoltre, nelle aziende in cui è documentata una regolare profilassi antielmintica, la prevalenza di questo parassita risultata essere ancora più bassa (Relf et al., 2013). In uno studio in cui la parassitosi è stata valutata nel corso del tempo la prevalenza è risultata essere maggiore (30% dei puledri) (Lyons e Tolliver, 2014). Thamsborg et al. (2017) hanno ipotizzato che l'aumento di prevalenza di questo parassita sia ascrivibile al ridotto uso dell'ivermectina nei puledri a causa dei fenomeni di antielmintico resistenza verso altri importanti parassiti quali *P. equorum* (Lyons e Tolliver, 2014); tuttavia, questa ipotesi dovrebbe essere confermata da studi futuri.

La tabella seguente (tabella 2.10) riporta le prevalenze di *S. westeri* ottenuti in corso di esami coprologici effettuati negli asini. Le indagini sono estremamente scarse e non sempre sono stati indagati i puledri, per cui molto spesso la parassitosi è da ritenersi sottostimata.

Le principali elmintosi nell'asino

Tab. 2.10 Prevalenza di *Strongyloides westeri* nel corso di indagini coprologiche in asini

PAESE	N° ASINI	N° POSITIVI	(%)	BIBLIOGRAFIA	
EUROPA					
Germania	46	1	2,2	Epe et al., 1993	
	37	+	+	Beelitz et al., 1996	
Italia	119	0	-	Giannetto et al., 2008	
	72	0	-	Trentini et al., 2010	
	91	6	6,6	Garippa et al., 2016	
Macedonia-Grecia	37	27	73	Sotiraki et al., 1997	
Turchia	81	10	12,3	Uslu e Guçlu, 2007	
	31	7	22,6	Umur and Açici, 2009	
AFRICA					
Burkina Faso	131	22	16,7	Vercruysse et al, 1986	
Gambia	173	7	4	Mattioli et al., 1994	
Sudan	1200	41	3,4	Seri et al., 2004	
Nigeria	100	15	15	Ahmed et al., 2008	
	NS	+	+	Ayele et al., 2006	
	2385	+	+	Getachew et al., 2008a	
	2935	323	11	Getachew et al., 2010a	
	324	252	77,8	Abebew et al., 2011	
	195	39	20	Nuraddis et al., 2011	
	Etiopia	417	178	42,8	Zerihun et al., 2011
		283	3	1,1	Sheferaw e Alemu, 2015
		384	36	9,4	Wako et al., 2016
		404	8	2,0	Gebreyohans et al, 2017
	NS	25	10,4	Getahun and Kassa, 2017	
	99	41	41,4	Kedir et l., 2017	
ASIA					
India	82	20	24,39	Shrikhande et al., 2009	
	67	5	7,46	Chitra et al., 2011	
	1794	305	17,2	Parsani et al 2013	
Iraq	56	16	28,57	Wannas et al., 2012	

NS: non specificato; +: positivo

2.6.4 Diagnosi

La diagnosi si basa sulla messa in evidenza delle uova larvate (40-52 x 32-40 µm) attraverso esami copromicroscopici (figura 2.17). È da tener presente che è possibile riscontrare un elevato numero di uova nelle feci non associate a sintomatologia clinica.



Fig. 2.17 Uovo di Strongyloides westeri all'esame coprologico per flottazione (40x) (Foto F. Buono)

2.7 Ordine Cestoda

I cestodi che parassitano gli equidi appartengono alla famiglia delle Anoplocephalidae e si dividono in tre differenti specie *Anoplocephala perfoliata*, *Anoplocephala magna* e *Paranoplocephala mammiliana* (Soulsby, 1968; Lichtenfels, 1975; Proudman et al., 1995). Una quarta specie, *Moniezia pallida*, è stata riportata in sud Africa e Angola (Soulsby, 1965b; Georgi, 1974; Spasskii, 1951).

A. perfoliata e *A. magna* sono due parassiti molto simili morfologicamente tuttavia variano notevolmente per le loro dimensioni, in quanto, *A. perfoliata* è larga 1-1,2 cm e lunga 4-8 cm, mentre *A. magna* è larga fino a 2,5 cm e lunga fino ad 80 cm.

Lo scolice di *A. perfoliata* arrotondato, di 2-3 mm di diametro, è inerme, presenta un lembo cuticolare al di sotto di ciascuna delle quattro ventose. Lo scolice di *A. magna* è simile ma più grande in diametro (4-6 mm) è inerme e privo di lembi al di sotto delle quattro ventose. Il collo di entrambe le specie è molto corto e lo strobilo è formato da proglottidi larghe e corte. Gli organi genitali di *A. magna* sono singoli ed i pori unilaterali. Le uova di *A. perfoliata* ed *A. magna* sono simili, irregolarmente sferiche o triangolari, dal diametro di 65-80 µm.

A. magna si rinviene principalmente nella parte terminale del piccolo intestino (digiuno) mentre *A. perfoliata* si localizza a livello della valvola ileocecale (Soulsby, 1982; French e Chapman, 1992), tuttavia uno studio condotto da Williamson et al. (1997) ha dimostrato che questo parassita si ancora a 4 regioni distinte nel tratto intestinale (l'81% è stato rinvenuto adeso alle pareti del cieco, il 17% a livello della valvola ileocecale, l'1,7% a livello dell'ileo e lo 0,2% nel colon ventrale). Uno studio simile ha riscontrato che in un'elevata percentuale di cavalli (47%) *A. perfoliata* si localizzava a livello della parete del cieco, mentre solo nel 9% dei cavalli è stato rinvenuto a livello della valvola ileocecale; il restante 44% dei soggetti presentava il parassita in entrambe le sedi (Fogarty et al., 1994). Tuttavia, il sito d'elezione sembrerebbe essere vicino alla giunzione ileocecale, con il 93% delle tenie che si rinviene in cluster entro 10 cm da questa sede (Williamson et al., 1997). *P. mammiliana*, invece, predilige localizzarsi a livello del duodeno; talvolta è possibile rinvenirla a livello gastrico (Soulsby, 1982; Urquhart et al., 1996).

2.7.1 Ciclo Biologico

Il ciclo biologico è di tipo indiretto e l'ospite intermedio è rappresentato da un acaro oribatide (Fukui, 1960; Denegri, 1993), nel quale, in circa 2-4 mesi, si sviluppa la forma larvale monosomatica: il cisticercoide.

Gli acari, generalmente a vita libera, si rinvencono principalmente sui pascoli permanenti (Bain e Kelly, 1977; Jacobs, 1986), dove la loro densità può raggiungere le 20.000 unità per metro quadro (Jacobs, 1986). Gli equidi si infettano ingerendo accidentalmente gli acari con all'interno il cisticercoide che, in sede intestinale, sviluppa a parassita adulto in circa 4-10 settimane (Soulsby, 1982; French e Chapman, 1992, Urquhart et al., 1996).

2.7.2 Patogenesi e segni clinici

Le principali lesioni provocate da *A. perfoliata* sono state ampiamente descritte da numerosi autori (Rodriguez-Bertos et al., 1999; Kjaer et al., 2007) e includono: ulcere, enterite catarrale, ispessimento della mucosa, della submucosa e della lamina propria, edema e produzione di tessuto di granulazione. Le ulcere a livello della giunzione ileo-cecale sono generalmente più severe rispetto a quelle che si riscontrano in altre regioni intestinali a parità di carica parassitaria. Nel cavallo numerosi studi hanno inoltre riportato una correlazione tra la presenza di tenie e intussuscezioni ileo-cecali, cieco-coliche, perforazioni intestinali (Foerner et al., 1980; Barclay et al., 1982; Beroza et al. 1983, 1986; Edwards, 1986; Owen et al. 1989; Williamson et al., 1997; Ryu et al. 2001) con conseguenti peritoniti (Barclay et al., 1982; Beroza et al., 1983, 1985), ostruzioni intestinali, dovute alla massa dei parassiti adesi alla parete del cieco o dell'ileo, (Slocombe, 1979; Beroza et al., 1983; Carmel 1988), ostruzioni meccaniche a livello della giunzione ileocecale (Bello, 1979; Carmel, 1988) ed ileo-ceco-colica ed insorgenza di coliche spasmodiche (Proudman e Holdstock, 2000; Veronesi et al., 2009; Pavone et al., 2010, 2011), tuttavia non ci sono dati relativi alla evoluzione clinica e patologica della infezione da cestodi nell'asino (Matthews e Burden, 2013).

2.7.3 Epidemiologia

A. perfoliata è il cestode di più comune riscontro nei cavalli con una prevalenza che varia dal 18 all'87% a livello mondiale (Lyon et al., 2000; Meana et al., 2005; Rebhein et al., 2011, 2013; Tomczuk et al., 2015).

Dati epidemiologici non sono disponibili per *A. mamillana*, in gran parte a causa della sua presenza rara e sporadica. Alcune evidenze suggeriscono che *A. perfoliata* risulta essere meno dominante rispetto a decenni fa e che *A. magna* era molto più comune di quanto lo sia oggi (Chapman et al. 2002). Le ragioni di questo possibile cambiamento non sono pienamente comprese; secondo alcuni autori l'incremento della prevalenza dei cestodi negli equidi potrebbe essere attribuita ai cambiamenti climatici che potrebbero influenzare la presenza e diffusione degli acari oribatidi (Geering e Johnson, 1990), alcuni ricercatori hanno però ipotizzato che frequenti trattamenti con lattoni macrociclici (LM), principalmente ivermectina, molecole che non hanno azione terapeutica nei confronti dei vermi piatti come le tenie, potrebbero aver determinato un aumento della prevalenza ed abbondanza di *A. perfoliata* e dei cestodi degli equidi in generale (Nielsen, 2015b).

Le cestodosi colpiscono i cavalli di tutte le età, tuttavia alcuni autori hanno riportato una prevalenza maggiore nei soggetti giovani (Urquhart et al., 1996; Roncoroni et al., 2017), mentre altri autori non hanno riportato alcuna correlazione con l'età (Lyons et al., 1984; Owen et al., 1988). Inoltre nei confronti di questi parassiti non sembrerebbe svilupparsi una immunità acquisita (Owen et al., 1988).

L'infezione sembra che abbia un andamento stagionale con un incremento durante i mesi invernali sia nell'emisfero nord che nell'emisfero sud (Lyons et al., 1984; Høglund et al., 1995). Uno studio spagnolo ha dimostrato variazioni stagionali per l'infezione da cestodi (Meana et al., 2005), infatti la maggior parte delle infezioni patenti è stata osservata nella seconda metà dell'anno. In Polonia e Svezia è stata rinvenuta una maggiore carica di *A. perfoliata* in cavalli macellati durante il quarto trimestre dell'anno (Tomczuk et al., 2015).

In Italia, nei cavalli due studi condotti in Sardegna hanno riportato una prevalenza ai cestodi rispettivamente dell'8 e del 16% (Scala e Cancedda, 1996; Scala et al., 2001) mentre in Umbria è stata rinvenuta una positività del 25,6% (Veronesi et al., 2008). Campigli et al. (2009) su 118 cavalli in Toscana hanno riscontrato una prevalenza del 20,5% mentre Roncoroni et al. (2017), nel Lazio, hanno riportato recentemente una prevalenza del

13% su 248 campioni di feci riportando una maggiore prevalenza nelle femmine e nei soggetti giovani.

Le stesse specie di cestodi che infettano i cavalli possono parassitare anche gli asini. Uno studio necroscopico effettuato in Burkina Faso ha riscontrato che 20/30 (66,6%) asini presentavano infestazione da parte di cestodi (Vercruyse et al., 1986). Getachew et al. (2010a), sempre nell'asino, hanno riportato risultati simili dimostrando la presenza della parassitosi in 6 su 7 asini (85,7%) agli esami necroscopici.

Gli studi epidemiologici effettuati sulle cestodosi asinine sono limitati e riportano prevalenze abbastanza simili tra loro (tabella 2.11). In Etiopia, Ayele et al. (2006) e Getachew et al. (2010a) hanno riportato una prevalenza rispettivamente del 7,4% ed 8%. In Turchia una prevalenza simile (6,5%) è stata riportata da Umur e Açıci (2009). In Italia mancano dati sulla presenza e prevalenza di Anoplocephalidae nella specie asinina (Veneziano, 2011).

Tab. 2.11 Prevalenza di Anoplocephalidae nel corso di indagini coprologiche in asini

PAESE	N° ASINI	N° POSITIVI	(%)	BIBLIOGRAFIA
EUROPA				
Germania	37	+	+	Beelitz et al., 1996
Turchia	81	5	6,17	Uslu e Guçlu, 2007
	31	2	6,45	Umur e Açıci, 2009
AFRICA				
Ciad	1015	5	0,4	Graber, 1970
Burkina Faso	30	8	27	Vercruyse et al., 1986
	963	+	+	Yoseph et al., 2005
	339	25	7,4	Ayele et al., 2006
	2385	+	+	Getachew et al., 2008a
	2935	235	8,0	Getachew et al., 2010a
	324 ^a	7 ^a	2,2 ^a	Abebew et al., 2011
324 ^b	18 ^b	5,6 ^b		
Etiopia	417	12	2,90	Zerihum et al., 2011
	504	8	1,6	Zeryhun e Tsegaw, 2016
	404	11	2,7	Gebreyohans et al., 2017
	NS	2	2,6	Getahun and Kassa, 2017
	99	5	5,0	Kedir et al., 2017
Uganda	26	4	15,4	Nakayima et al., 2017
ASIA				
India	1794	18	1,0	Parsani et al 2013

^aarea di studio; ^barea controllo; +: positivo; NS: non specificato

2.7.4 Diagnosi

L'approccio parassitologico tradizionale per la diagnosi degli elminti intestinali è l'esame coprologico volto a identificare le uova nelle feci (figura 2.18).

Questo è stato sviluppato per la ricerca delle uova di Anoplocephalidae nel cavallo con approcci diversi quali la sedimentazione, la flottazione qualitativa e/o quantitativa e varie combinazioni di queste tecniche.

Nella tabella sottostante (tabella 2.12) sono riassunti gli studi di validazione condotti con differenti tecniche coprologiche per la diagnosi di uova di *A. perfoliata* nel cavallo.

Le principali elmintosi nell'asino

Tab. 2.12 *Rappresentazione schematica degli studi di validazione condotti con differenti tecniche coprologiche per la diagnosi di uova di Anoplocephala perfoliata (modificato da Nielsen, 2015b)*

Tecnica	gr. di feci analizzati	Modifiche	Sensibilità (%)	Specificità (%)	Bibliografia
Sedimentazione	50	-	22,5	-	Williamson et al. (1998)
	50	-	8,3	-	Tomckuz et al. (2014)
Flottazione	5	-	16,7	-	Tomckuz et al. (2014)
	5	-	37,5	-	Williamson et al. (1998)
Sedimentazione/Flottazione	50 (25)	-	25	-	Williamson et al. (1998)
	50	-	58,3	-	Tomckuz et al. (2014)
McMaster	5	Flottazione	8,0	-	Meana et al. (1998)
	2	Flottazione	2,8	-	Tomckuz et al. (2014)
	30	Centrifugazione	23	100	Nilsson et al. (1995)
	40 (20)	Centrifugazione	42	-	Meana et al. (1998)
	40	Centrifugazione	61	98	Proudman e Edwards (1992)
Wisconsin	5	Centrifugazione	62	-	Slocombe (2004)
	10	Centrifugazione	54	100	Skotarek et al. (2010)
	30	Centrifugazione	46	-	Kjær <i>et al.</i> (2007)
	40 (20)	Flottazione	38	-	Meana et al. (1998)

Uno dei principali problemi da affrontare nella diagnosi della cestodosi equina è la presenza di falsi negativi, a causa sia dell'escrezione intermittente delle uova nelle feci che per la bassa concentrazione che le stesse hanno nel materiale fecale (Slocombe, 2006). Solo alcuni studi hanno generato dati sulla specificità diagnostica, ma si trovano in un intervallo del 98-100% (Proudman e Edwards 1992; Nilsson et al 1995; Skotarek et al. 2010) che indicano un basso tasso di falso positivo. Le sensibilità diagnostiche più basse (2,8 e 8,0%) sono state ottenute con versioni standard della tecnica McMaster (Meana et al 1998; Tomczuk et al., 2014).

Il metodo raccomandato per la diagnosi di tenie nel cavallo è la tecnica di flottazione-sedimentazione che ha una sensibilità di circa il 50% (Gundalch et al., 2003; Williamson et al., 1998); tuttavia altri autori hanno riscontrato una sensibilità che varia dal 40% al 62% (Gasser et al., 2005) e al 75% (Rehbein et al., 2011). Conseguentemente, a meno che un cavallo non sia parassitato da un'elevata carica infettante, il riscontro delle uova attraverso un esame parassitologico standard è difficile. Una modifica che prevede la centrifugazione, si basa sull'utilizzo di una tecnica diagnostica che analizza 40 grammi di feci ed è caratterizzata da una sensibilità e da una specificità rispettivamente dello 0,61 e dello 0,98 (Proudman e Edwards, 1992). Nielsen (2015b) suggerisce che la flottazione associata alla centrifugazione aumenta notevolmente la sensibilità diagnostica rispetto ai metodi basati solo sulla flottazione passiva. Uno studio ha evidenziato che una soluzione flottante a base di saccarosio (peso specifico PS = 1.260) ha generato significativamente maggiori conteggi di uova di *Anoplocephala* spp. rispetto ad una soluzione a base di zinco solfato (PS = 1.300) e cloruro di sodio (PS = 1,200) (Rehbein et al. 2011) e che la scelta della strumentazione per la flottazione può influenzare anche le performance diagnostiche, ma questo non è ancora completamente studiato. La tecnica FLOTAC è stata sviluppata come tecnica di conteggio di uova di parassiti e risulta altamente sensibile con una bassa variabilità (Cringoli et al. 2010); uno studio ha dimostrato che questa tecnica risulta più sensibile alla diagnosi di infezione da cestodi negli equini se comparato a tecniche molecolari (Chlastakova et al. 2009).



Fig. 2.18 Uovo di *Anoplocephala* spp. all'esame coprologico per flottazione (40x)
(Foto F. Buono)

Oltre alle metodiche coprologiche un ELISA è attualmente disponibile per la determinazione degli anticorpi verso gli antigeni escretori/secretori (12/13 kDalton) di *A. perfoliata*. Questo test ELISA è stato validato con la determinazione della sensibilità (68%) e specificità (95%) correlati ad una popolazione elmintica nota (Proudman e Trees, 1996), tuttavia l'interpretazione dei risultati non è chiara. Uno studio condotto nei macelli in Danimarca con questo metodo sierologico ha rilevato un elevato livello di anticorpi verso *A. perfoliata* in cavalli negativi alla necropsopia individuando una elevata proporzione di falsi positivi (Kjær et al., 2007). Un altro studio ha valutato i livelli di anticorpi dopo i trattamenti verso i cestodi e ha evidenziato che i cavalli risultano sieropositivi per 5 mesi circa dopo il trattamento (Abbott et al., 2008). In aggiunta in cavalli coinfecti da *A. perfoliata* e *A. magna* si è potuto riscontrare una perdita di specificità del test ELISA (Meana et al., 2009). Questi risultati indicano che il titolo anticorpale riflette una esposizione ai cestodi piuttosto che la presenza di infezione. La sierologia ELISA rimane un test utile per determinare una esposizione pregressa ai cestodi nell'azienda, ma un risultato positivo per un singolo soggetto non può essere considerato come indicatore certo di infezione in corso (Reinemeyer e Nielsen, 2013). Recentemente alcuni studi hanno inoltre dimostrato che esami sulla saliva sono altamente sensibili per la diagnosi di cestodosi nei cavalli (Lightbody et al., 2016, 2017). In particolare è stata riscontrata una elevata

correlazione tra l'intensità dell'infezione e la positività ai test sierologici. Il test salivare identificerebbe quindi la presenza di infezione da cestodi con una sensibilità pari all'83% ed una specificità del 85%. Gli animali dovrebbero essere sottoposti al test salivare (Equisal) due volte l'anno (tardo inverno/inizio primavera e autunno/inizio inverno) e non dovrebbero essere sottoposti a trattamento nei quattro mesi antecedenti il test (Tzelos e Matthews, 2016).

Inoltre, anche un ELISA verso i coproantigeni ha dato buoni risultati verso la diagnosi di *A. perfoliata*, con una sensibilità del 74% e specificità del 92% (Kania e Reinemeyer, 2005; Skotarek et al., 2010), questo test ha potenzialità per essere applicato in campo.

Una polymerase chain reaction assay (PCR) è stato sviluppato per la determinazione del DNA di *A. perfoliata* in campioni di feci (Drogemuller et al. 2004). Più di recente, è stato sviluppato una multiplex PCR per rilevare contemporaneamente il DNA di tutti e tre i cestodi Anoplocephalidae equini con limite di rilevazione di 50 uova per campione (Bohorquez et al., 2015). Anche se questa tecnica sembra promettente, la sensibilità diagnostica deve essere migliorata per generare risultati utili nel campo (Nielsen, 2015b). Nell'asino è stata condotta una indagine sieropidemiologica sulle cestodosi in Etiopia utilizzando un test sviluppato per i cavalli. Una serie di valori di densità ottica (ELISA OD) sono stati ottenuti. Il 7,5% degli asini erano altamente infetti mentre il 26% risultavano moderatamente infetti con un valore generale di sieroprevalenza del 34%. Il restante 66% degli animali testati presentavano con una bassa infezione o negativi (Getachew et al., 2012).

2.8 Ordine Trematoda

I parassiti appartenenti alle famiglie Fasciolidae, Dicrocoeliidae, Paramphistomatidae e Schistosomatidae sono i principali trematodi di importanza veterinaria. La famiglia Fasciolidae è costituita da tre importanti generi: *Fasciola*, *Fascioloides* e *Fasciolopsis* (Soulsby, 1982; Urquhart et al., 1996). Tra questi, i parassiti appartenenti al genere *Fasciola* si rendono responsabili, a livello mondiale, della fasciolosi dei ruminanti (Torgerson e Claxton, 1999) e della fasciolosi umana (Mas-Coma et al., 1999) e *F. hepatica* e *F. gigantica* sono occasionalmente riportate nei cavalli ed asini (Matthews e Burden, 2013). I parassiti adulti vivono nei dotti biliari mentre le larve nel parenchima epatico. Occasionalmente si possono rinvenire incapsulate in altri organi quali polmoni, pancreas e linfonodi (Urquhart et al., 1996).

Gli adulti sono caratterizzati da un colore verde-marroncino e misurano circa 2,5-3,5 cm. Il tegumento è ricoperto con delle spine orientate posteriormente. Le uova (130-150 x 65-90 µm) sono ovoidali, caratterizzate dalla presenza di un opercolo e di colore giallognolo.

Il ciclo biologico (descritto in precedenza nel Capitolo 2.1) è di tipo indiretto e l'ospite intermedio è rappresentato da una lumaca appartenente al genere *Galba* (sin. *Lymnaea*) di cui la più comune è *L. truncatula*.

2.8.1 Patogenesi

La patogenesi e la sintomatologia clinica è stata studiata principalmente nei ruminanti, ospiti principali di questo trematode. È possibile dividere la patogenesi della fasciolosi in due fasi: la prima fase provocata dalla migrazione del parassita immaturo nel parenchima epatico ed è associato ad un danno epatico con emorragie; la seconda fase, invece, si manifesta quando i parassiti adulti sono a livello dei dotti biliari ed è determinata dall'attività ematofaga del parassita e dal danneggiamento a carico della mucosa biliare da parte delle spine presenti sulla cuticola dell'elminta.

I principali reperti anatomopatologici che si riscontrano sono colangiti e fibrosi epatica (Urquhart et al., 1996). Poco si conosce sulla patogenesi della fasciolosi negli equidi.

2.8.2 Epidemiologia

Negli equidi *F. hepatica* si riscontra in maniera accidentale o occasionale (Lichtenfels, 1975) ed alcuni autori ritengono che gli equidi, rispetto ai ruminanti, siano più resistenti nei confronti di questa parassitosi (Boray, 1969; Nansen et al., 1975).

La parassitosi nel cavallo assume una distribuzione mondiale (Perler et al., 1997; Morales et al, 2000; Haridity et al; 2002). Nel 1977 Owen riportò 38 casi di infezione da *Fasciola* spp. in cavalli che condividevano il pascolo con vacche. I cavalli presentavano inappetenza, scarse performance e scadimento delle condizioni generali, tuttavia pochi cavalli dimostrarono i classici segni clinici associati alla fascioliasi nei grossi e piccoli ruminanti (Urquhart et al., 1996).

Nell'asino è stata riportata una prevalenza maggiore rispetto al cavallo; Pankhurst (1963), per esempio, nell'asino ha riportato una prevalenza di *F. hepatica* del 33%, mentre nel cavallo solo dello 0,1%. Nell'asino *F. hepatica* è stata riportata con prevalenze inferiori al 10% in Turchia, Marocco ed Egitto, ma in aree endemiche le positività sono rilevanti, 17% in Irlanda e 44% in Etiopia. Studi in Bolivia hanno dimostrato che, dopo i ruminanti, l'asino è l'ospite definitivo più frequente e ha un ruolo importante nella trasmissione di questa zoonosi all'uomo (Veneziano, 2011).

Nella tabella 2.13 sono riportate le prevalenze di fascioliasi in corso di indagini epidemiologiche.

Le principali elmintosi nell'asino

Tab. 2.13 Prevalenza di *Fasciola hepatica* nel corso di indagini coprologiche in asini

PAESE	N° ASINI	N° POSITIVI	(%)	BIBLIOGRAFIA
EUROPA				
EIRE	43	27	63,0	Hatch, 1966
Germania	37	+	+	Beelitz et al., 1996
Inghilterra	200	17	8,5	Trawford e Tremlett, 1996
	735	29	4,0	Burden, dati non pubblicati
Turchia	81	5	6,17	Uslu e Guçlu, 2007
	31	5	16,13	Umur and Açıci, 2009
AFRICA				
Ciad	183	1	0,5	Graber, 1970
Egitto	156	29	18,6	Hasslinger e El-Seify, 1996
	NS	NS	3,0	Haridy et al., 2002
	78	6	7,7	Badawy et al., 2014
	339	5	1,5	Ayele et al. 2006
	2935	2348	51,0	Getachew et al., 2010a
	803	359	44,7	Getachew et al., 2010b
	324	21	6,5	Abebew et al., 2011
	324	25	7,7	
	417	41	9,8	Zerihun et al, 2011
	154	8	5,2	Regassa e Yimer, 2013
	279	16	5,73	Mezgebu et al., 2014
	384	59	15,4	Biniam e Abdisa, 2015
	283	47	16,6	Sheferaw e Alemu, 2015
	504	31	6,1	Zeryhun e Tsegaw, 2016
	384	14	3,6	Wako et al., 2016
404	9	2,2	Gebreyohans et al., 2017	
300	6	4	Getahun e Kassa 2017	
99	5	5,0	Kedir et al., 2017	
384	6	1,6	Mohamee et al., 2017	
AMERICA				
Messico	1	1	100	Collins, 1961

+: positivo

Fahmy e El-Attar (1990), in corso di studi necroscopici in 14 asini, 3 muli, 8 cavalli e 50 cammelli hanno riscontrato l'infezione in 2 asini (8%) e 6 cammelli (12%) ma non nei cavalli. Sempre in corso di esami necroscopici *F. hepatica* è stata rinveuta in 4/65 asini (Ahmed et al., 2011). Uno studio condotto in Egitto su 53 asini macellati e 78 campioni fecali ha evidenziato una prevalenza di fascioliasi rispettivamente del 17% e del 6% (Badawy et al., 2014). Un ulteriore studio condotto *post mortem* in 60 asini del *The Donkey Sanctuary*, provenienti dall'Irlanda, ha evidenziato la presenza di *F. hepatica* in 34/200 fegati (17%) ispezionati (Trawford e Tremlett, 1996).

Bibliografia

- Abebew, D., Endebu, B., Gizachew, A. (2011). Status of parasitism in donkeys of project and control areas in central region of Ethiopia: a comparative study. *Ethiopian Veterinary Journal*, 15(2): 45-55.
- Abbott, J.B., Mellor, D.J., Barrett, E.J., Proudman, C.J., Love, S. (2008). Serological changes observed in horses infected with *Anoplocephala perfoliata* after treatment with praziquantel and natural reinfection. *Veterinary Record*, 162: 50-53.
- Abuldaze, K.I. (1937). Novaya nematoda Ioshadi *Caballonema longicapsulatum* (Trichonematinae) nov. gen. nov. sp. [New nematode from horse *Caballonema longicapsulatum* (trichonematinae) nov. gen. nov. sp.]. Raboty po Gelmintologii. Izd-vo VASKhNIL, Moscow, 1-4 (in Russian).
- Ahmed, M.I., Tijjani, A.N., Mustapha, A.R. (2008). Survey for common diseases and management practices of donkeys (*Equus asinus*) in Borno State, Nigeria. *Nigerian Veterinary Journal*, 29(3): 1-5.
- Ahmed, N.E., El-Akabawy, L., Ramadan, M.Y., Radwan, A.M.M. (2011). Studies on helminth parasites in necropsied donkeys in Egypt. *Benha Veterinary Medical Journal – Special Issue*, 1: 153-162.
- Andersen, S. e Fogh, J. (2010). Prevalence of lungworm *D. arnfieldi* in donkeys in Denmark and in horses in herds together with donkeys. *Nord Veterinary Medicine*, 33: 484-491.
- Anteneh, W. e Getachew, S. (2017). Gastrointestinal nematodes of donkey and horses in Gondar town northwest, Ethiopia. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health*, 9(5): 88-91.
- Armstrong, S.K., Woodgate, R.G., Gough, S., Heller, J., Sangster, N.C. and Hughes, K.J. (2014). The efficacy of ivermectin, pyrantel and fenbendazole against *Parascaris equorum* infection in foals on farms in Australia. *Veterinary Parasitology*, 205: 575-580.
- Arslan, M.O. e Umur, S. (1998). The helminth and *Eimeria* (Protozoa) species in horse and donkey in Kars province of Turkey. *Turkiye Parazitoloji Dergisi*, 22: 180-184.
- Ayaz, E. (2003). The prevalence of *Dictyocaulus arnfieldi* (Cobbold, 1884) in horses and donkeys. *Veterinary Fak. Turkiye Parazitoloji Dergisi*, 14: 77-81.
- Ayele, G., Feseha, G., Bojia, A., Joe, A. (2006). Prevalence of gastrointestinal parasites of donkeys in Dudga Bora District, Ethiopia. *Livestock Research for Rural Development*, 18: 2-6
- Ayele, G. e Dinka, A. (2010). Study on strongyles and parascaris parasites population in working donkeys of central Shoa, Ethiopia. *Livestock Research for Rural Development*, 22(12): 1-5.
- Babeva, M. (1975). Izuchenie biologii vzbuditelei probstmaiiiioza odnokopytnykh. *Trudy Uzbekskogo Nauchnoissledovatel' skogo Veterinarnogo Institut*, 20: 43-47. 1972. (Abs. Vet. Bull. 45: 585. 1975).
- Badawy, A., Abouzaid, N., Merwad, A. (2014). Occurrence of zoonotic fascioliasis in donkeys in Egypt with emphasis on PCR-RFLP of 28S rRNA gene. *Revue de Medicine Veterinaire*, 165(5-6): 167-171.
- Baermann, G. (1917). Eine einfache Methode zur Auffindung von Ankylostomum (Nematoden) – Larvan in Erdproben. *Geneseek Tijdschr Ned-Indie*, 57: 131-137.

- Bain, S.K. e Kelly, J.D. (1977). Prevalence and pathogenicity of *A. perfoliata* in a horse population in South Auckland. *The New Zealand Veterinary Journal*, 25: 27-28.
- Bakirci, S., Çirak, V.K., Güleğen, E., Karabacak, A. (2004). Parasites found by fecal examinations in horses in the Gemlik Military Stud Farm. *Turkiye Parazitoloji Dergisi*, 2: 329-336.
- Baker, D.W., Salisbury, G.W., Britton, J.W. (1939). Control of equine strongylosis. I. The effects of natural factors on development of strongylosis in foals. *Cornell Veterinarian*, 29: 297-308.
- Barclay, W.P., Phillips, T.N., Foerner, J.J. (1982). Intussusception associated with *Anoplocephala perfoliata* infection in five horses. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 180: 752-753.
- Baudena, M., Chapman, M., French, D., Klei, T. (2000). Seasonal development and survival of equine cyathostome larvae on pasture in south Louisiana. *Veterinary Parasitology*, 88: 51-60.
- Beelitz, P., Gobel, E., Gothe, R. (1996). Endoparasites of donkeys and horses kept together in upper Bavaria: range of species and intensity of infestation. *Tierärztliche Praxis*, 24(5), 471-475.
- Bello, T.R. (1979). Perspectives on current equine anthelmintic therapy: misunderstanding and classification. *Proceedings of American Association of Equine Practitioners*, 25: 261-265.
- Beroza, G.A., Barclay, W.P., Phillips, T.N., Foerner, J.J., Donawick, W.J. (1983). Caecal perforation and peritonitis associated with *Anoplocephala perfoliata* infections in three horses. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 183: 804-806.
- Beroza, G.A., Williams, R., Marcus, L.C., Mille, P. (1985). Prevalence of tapeworm infection and associated with large bowel disease in horse. *Proceedings of the 2nd equine colic symposium*. Georgia, pp. 21-25.
- Beroza, G.A., Marcus, L.C., Williams, R. and Bauer, S.M. (1986). Laboratory diagnosis of *Anoplocephala perfoliata* infection in horses. *The American Association of Equine Practitioners*, 32: 435-439.
- Biniyam, T. e Abdisa, C. (2015). Prevalence of endoparasitic helminths of donkeys in and around Haramaya district, Eastern Ethiopia. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health*, 7(6): 221-224.
- Biocca, E., Nascetti, G., Iori, A., Costantini, R., Bullini, L. (1978). Descrizione di *Parascaris univalens*, parassita degli equine, e suo differenziamento da *Parascaris equorum*. *Accademia Nazionale dei Lincei, Rend Cl Sc Fi Mat Nat*, 65: 133-141.
- Bohorquez, A., Luzon, M., Hernandez, R.M., Meana, A. (2015). New multiplex PCR method for the simultaneous diagnosis of the three known species of equine tapeworm. *Veterinary Parasitology*, 207: 56-63.
- Boersema, J. e Kalis, C.H. (1978). Survey of the incidence of *Dictyocaulus arnfieldi* infections in donkeys in the Netherlands (author's transl). *Tijdschrift voor diergeneeskunde*, 103(19): 998-1001.
- Bogale, B, Sisay, Z., Chanie, M. (2012). Strongyle Nematode Infection of Donkeys and Mules in and Around Bahirdar, Northwest Ethiopia. *Global Veterinaria*, 9(4): 497-501.
- Bohórquez, A., Meana, A., Pato, N.F., Luzón, M. (2014). Coprologically diagnosing *Anoplocephala perfoliata* in the presence of *A. magna*. *Veterinary Parasitology*, 204: 396-401.

- Boray, J.C. (1969). Experimental fascioliasis in Australia. *Advances in Parasitology*, 7: 95-210.
- Borji, H., Moosavi, Z., Ahmadi, F. (2014). Cranial mesenteric arterial obstruction due to *Strongylus vulgaris* larvae in a Donkey (*Equus asinus*). *Iranian Journal of Parasitology*, 9(3): 441-444.
- Borovkova, A. (1948). Veterinariya Moscow, 25:13.
- Boulenger, Ch. L. (1920). Sclerostomes of the donkey in Zanzibar and East Africa. *Parasitology*, 12: 27-32.
- Boveri, T. (1887). Über Differenzierung der Zellkerne während der Fürchung des Eies von *Ascaris megalcephala*. *Anatomischer Anzeiger*, 2: 688-693.
- Bowman, D.D. (2003). Georgis' Parasitology for Veterinarians, (8th ed.). USA, New York Saunders, pp. 166-168.
- Bracken, M.K., Wöhlk, C.B., Petersen, S.L., Nielsen, M.K. (2012). Evaluation of conventional PCR for detection of *Strongylus vulgaris* on horse farms. *Veterinary Parasitology*, 184(2-4): 387-391.
- Brown, C.A., MacKay, R.J., Chandra, S., Davenport, D., Lyons, E.T. (1997). Overwhelming strongyloidosis in a foal. *Journal of American Veterinary Medicine Association*, 211: 333-334.
- Brown, P.J. e Clayton, H.M. (1979). Hepatic pathology of experimental *Parascaris equorum* infection in worm-free foals. *Journal of Comparative Pathology*, 89: 115-123.
- Bu, Y., Ni, H., Gasser, R.B., Beveridge, I., Zhang, L. (2009). Strongyloid nematodes in the caeca of donkeys in Henan Province, China. *Acta Parasitologica*, 54(3): 263-268.
- Bullini, L., Nascetti, G., Ciafre, S., Rumore, F., Biocca, E. (1978). Ricerche cariologiche ed elettroforetiche su *Parascaris univalens* e *Parascaris equorum*. *Accademia Nazionale dei Lincei, Rend. Cl. Sc. Fis. Mat. Nat.*, 65: 151-156.
- Burden, F.A., Du Toit, N., Hernandez-Gli, M., Prado-Ortiz, O., Trawford, A.F. (2010). Selected health and management issues facing working donkeys presented for veterinary treatment in rural Mexico: some possible risk factors and potential interbention strategies. *Tropical Animal Health and Production*, 42(4): 597-05.
- Burgu, A., Doganay, A., Oge, H., Sarimehmetoglu, O., Ayaz, E. (1995). Helminth species found in donkeys. *Veteriner Fakultesi Dergisi*, 42(2): 207-215.
- Burk, S.V., Dangoudoubiyam, S., Brewster-Barnes, T., Bryant, U.K., Howe, D.K., Carter, C.N., Vanzant, E.S., Harmon, R.J., Kazacos, K.R., Rossano, M.G. (2014). In vitro culture of *Parascaris equorum* larvae and initial investigation of parasite excretory-secretory products. *Parasitology Research*, 113: 4217-4224.
- Campigli, M., Fichi, G., Rondoletti, A., Pellegrini, D., Tambini, P., Ming, K., Traversa, D., Perrucci, S. (2009). Infestazione da anaplocefalidi (Cestoda, Cyclophyllidea) in cavalli allevati in Toscana. *Ippologia*, 1: 33-38.
- Carmel, D.K. (1988). Tapeworm infection in horses. *Journal of Equine Veterinary Sciences*, 8: 343.
- Chapman, M.R., French, D.D., Klei, T.R. (2002). Gastrointestinal helminths of ponies in Louisiana: a comparison of species currently prevalent with those present 20 years ago. *Journal for Parasitology*, 88: 1130-1134.
- Chapman, M.R., French, D.D., Klei, T.R. (2003). Prevalence of strongyles nematodes in naturally infected ponies of different ages and during different seasons of the year in Louisiana. *Journal of Parasitology*, 89: 309-314.

- Chitra, R., Rajendran, S., Prasanna, D., Kirubakaran, A. (2011). Influences of age on the prevalence of Parasitic infections among donkeys in Erode district, amilnadu, India. *Veterinary World*, 4(6): 258-259.
- Chlastakova, I., Vavrouchova, E., Kamler, M., Bodecek, S., Koudela, B. (2009). Comparison of coprological and molecular techniques for the diagnosis of *Anoplocephala perfoliata* infection of the horse. In: *World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology Congress*. Calgary, Canada, Abstract, p. 161.
- Clayton, H.M. (1986). Ascarids: Recent advances. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 2(2): 313-329.
- Clayton, H.M. e Duncan, J.L. (1977). Experimental *Parascaris equorum* infection of foals. *Research in Veterinary Science*, 23: 109-114.
- Clayton, H.M. e Duncan, J.L. (1979). The migration and development of *Parascaris equorum* in the horses. *International Journal of Parasitology*, 9: 285-292.
- Coffman, J.R. e Carlson, K.L. (1971). Verminous Arteritis in Horses. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 158: 1358-1360.
- Coles, G.C., Eysker, M., Hodgkinson, J.E., Matthews, J.B., Kaplan, R.M., Klei, T.R., Sangster, N.C. (2003). Anthelmintic resistance and use of anthelmintics in horse. *Veterinary Record*, 153: 636.
- Coles, G.C., Jackson, F., Pomroy, W.E., Prichard, R.K., von Samson-Himmelstjerna, G., Silvestre, A., Taylor, M.A., Vercruyse, J. (2006). The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*, 136: 167-185.
- Collins, D.R. (1961). Fascioliasis in Mexican burro. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 139(12): 1321-1323.
- Corning, S. (2009). Equine cyathostomins: a review of biology, clinical significance and therapy. *Parasites and Vectors*, 2: S1 doi: 10.1186/1756-3305-2-S2-S1.
- Cribb, N.C., Cote, N.M., Boure, L.P., Peregrine, A.S. (2006). Acute small intestinal obstruction associated with *Parascaris equorum* infection in young horses: 25 cases (1985-2004). *The New Zealand Veterinary Journal*, 54: 338-343.
- Cringoli, G., Rinaldi, L., Maurelli, M.P., Utzinger, J. (2010). FLOTAC: new multivalent techniques for qualitative and quantitative copromicroscopic diagnosis of parasites in animal and humans. *Nature Protocols*, 5: 503-511.
- Edar, R.K., Pal, Y., Kumar, S., Ghorui, S.K., Legha, R.A., Singh, R.K. (2011). Therapeutic evaluation of ivermectin against endoparasites of donkey. *Veterinary Practitioner*, 12(1): 86-87.
- Demir, S., Tinar, R., Aydin, L., Cirak, V.Y., Ergul, R. (1995). Prevalence of helminth species by fecal examination in equines of Bursa. *Turkiye Parazitoloji Dergisi*, 19(1): 124-131.
- Denegri, G.M. (1993) Review of oribatid mites as intermediate hosts of tapeworms of the Anoplocephalidae. *Experimental and Applied Acarology*, 17: 567-580.
- Dibala, M.D., Getachew, A.M., Zerihun, A., Alemayu, F., Manyahilishal, E., Seyoum, F., Lemessa, G., Burden, F. (2017). Seasonal variation of strongylosis in working donkeys of Ethiopia: a cross-sectional study. *Parasitology Research*, 116(7): 2009-2015.

- Dipietro, J.A. e Todd, K.S. (1988). Chemoterapeutic tretament of larvae and migratory stages of *Parascaris equorum*. *Proceedings of American Association of Equine Practitioners*, 34: 611-618.
- Dipietro, J.A., Klei, T.R., French, D.D. (1990). Contemporary topics in equine parasitology. *Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian*, 12(5): 713-721.
- Donoghue, E.M., Lyons, E.T., Bellaw, J.L., Nielsen, M.K. (2015). Biphasic appearance of corticated and decorticated ascarid egg shedding in untreated horse foals. *Veterinary Parasitology*, doi: 10.1016/j.vetpar.2015.09.003. [Epub ahead of print].
- Drögemüller, M., Beelitz, P., Pfister, K., Schnieder, T., von Samson-Himmelstjerna, G. (2004) Amplification of ribosomal DNA of Anoplocephalidae: Anoplocephala perfoliata diagnosis by PCR as a possible alternative to coprological methods. *Veterinary Parasitology*, 124: 205-215.
- Drudge, J.H., Lyons, E.T., Szanto, J. (1966). Pathogenesis of migrating stage of helminths, with special reference to *Strongylus vulgaris*. In *Biology of Parasites*. E.J.L. Soulsby, Editor. pp. 199-214. New York and London: Academic Press.
- Drudge, J.H. e Lyons, E.T. (1977). Pathology of infections with internal parasites of horses. *the Blue Book for Veterinarian*, 27: 267-275.
- Drudge, J.H. e Lyons, E.T. (1983). *Oxyuris* infection. In: N.E. Robinson (ed). *Current Therapy in Equine Medicine*. W.B. Saunders co., Philadelphia, USA. pp 288-289.
- Duncan, J.L. (1973). The life cycle, pathogenesis and epidemiology of *S. vulgaris* in the horse. *Equine Veterinary Journal*, 5: 20-25.
- Duncan, J.L. (1974a). *Strongylus vulgaris* infection in the horse. *Veterinary Record*, 95: 34-37.
- Duncan, J.L. (1974b). Field studies on the epidemiology of mixed strongyle infection in the horse. *Veterinary Record*, 13: 337-344.
- Duncan, J.L. e Pirie, H.M. (1972). The life cycle of *Strongylus vulgaris* in the horse. *Research in Veterinary Science*, 13: 374-379.
- Duncan, J.L. e Pirie, H.M. (1975). The pathogenesis of single experimental infections with *Strongylus vulgaris* in foals. *Research in Veterinary Science*, 18: 82.
- Duncan, J.L., Abbott, E.M., Arundel, J.H., Eysker, M., Klei, T.R., Krecek, R.C., Lyons, E.T., Reinemeyer, C., Slocombe, J.O. (2002). World association for the advancement of veterinary parasitology (WAAVP): second edition of guidelines for evaluating the efficacy of equine anthelmintics. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP). *Veterinary Parasitology*, 103:1-18.
- Dunn, A.M. (1978). *Veterinary Helminthology*. London: William Heinemann Medical Books Ltd, 38.
- Edwards, G.B. (1986). Surgical management of intussusceptions in the horse. *Equine Veterinary Journal*, 18: 313-321.
- Enigk, K. (1949) Zur Biologie und Bekämpfung von *Oxyuris equi*. *Zeitschrift Fur Tropenmedizin Und Parasitologie* 1, 259-272.
- Enigk, K. (1951). Weitere Untersuchungen zur Biologie von *Strongylus vulgaris* (Nematodes) im Wirtstiere. *Zeitschrift Fur Tropenmedizin Und Parasitologie*, 2: 523-535.

- Enigk, K. (1970). The development of the three species of *Strongylus* of the horse during the prepatent period. In Proceedings of the Second International Conference on Equine Infectious Diseases. Paris (1969), Vol. 2, pp. 259-268. Basel, Switzerland: S. Karger.
- Epe, C., Ising-Volmer, S., Stoye, M. (1993). Parasitological fecal studies of equids, dogs, cats and hedgehogs during the years 1984-1991. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 100(11): 426-428.
- Ershov, V.S. (1943). Diferentsialny diagnoz nematod roda Trichonema, parazituuschikh u loshadei [Differential diagnosis of nematodes of the genus Trichonema found in horses]. *Trudy Kirovskogo Zoovet. Instituta*, 5: 61-86 (in Russian).
- Ershov, V.S. (1970). The biology of horse strongyles and the allergic reactions caused by them. In Proceedings of the Second International Conference on Equine Infectious Diseases. Paris (1969), Vol. 2, pp. 304-309. Basel, Switzerland: S. Karger.
- Esteban, M.R., Giovinazzo, G., Goday, C. (1995). Chromatin diminution is strictly correlated to somatic cell behaviour in early development of the nematode *Parascaris univalens*. *Journal of Cell Science*, 108: 2393-2404.
- Eysker, M.J. e Pandey, V.S. (1987). Overwintering of nonmigrating strongyles in donkeys in the Highveld of Zimbabwe. *Reserch in Veterinary Science*, 42(2): 262-263.
- Eysker, M.J., Kooyman, F.N.J., Mirck, M.H. (1986). Control of strongylosis in horses by alternative grazing. *Veterinary Parasitology*, 19: 10-115.
- Fahmy, M.F.M. e El-Attar, S.R. (1990). Pathological study on fascioliasis in camel and solipeds. *Egyptian Journal of Comparative Pathology and Clinical Pathology*, 3(2): 285-291.
- Fairbairn, D. (1957). The biochemistry of Ascaris. *Experimental Parasitology*, 6(5): 491-554.
- Feye, A. e Bekele, T. (2016). Prevalence of equine lung worm (*Dictyocaulus arnfieldi*) and its associated risk factors in Jimma Town, South West Ethiopia. *Advances in Life Science and Technology*, ISSN 2224-7181 (Paper) ISSN 2225-062X (Online), 40.
- Fikru, R., Reta, D., Teshale, S., Bizunesh, M. (2005). Prevalence of equine gastrointestinal parasites in Western highlands of Oromia. *Bulletin of Animal Health and Production in Africa*, 3: 161-166.
- Foerner, J.J., Phillips, T.N., Barclay, W.P. (1980) Surgical diseases of the large intestine. *The American Association of Equine Practitioners*, 26: 231-234.
- Fogarty, U., del Piero, F., Purnell, R.E., Mosurski, K.R. (1994). Incidence of *Anaplocephala perfoliata* in horses examined at the Irish abattoir. *Veterinary Record*, 134: 515-518.
- Francisco, I., Arias, M., Cortinas, F.J., Francisco, R., Mochales, E., Dacal, V., Suarez, J.L., Uriarte, J., Morrondo, P., Sanchez-Andrade, R., Diez-Banos, P., Paz-Silva, A. (2009). Intrinsic factors influencing the infection by helminth parasites in horses under oceanic climate area (NW Spain). *Journal of Parasitology Research*, Article ID 616173, <http://dx.doi.org/10.1155/2009/616173>.
- Fraser, C.M. (1991). The Merck Veterinary Manual. A hand book of Diagnosis Therapy and Disease prevention and control for the Veterinarians. (7th ed.), Merck and Co, Inc, Rahaway, NIT, USA, pp. 714-717.
- French, D.D. e Chapman, M.R. (1992). Tapeworms of the equine gastrointestinal tract. *Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian*, 14(5): 655-661.

- Fritzen, B., Rohn, K., Schnieder, T., von Samson-Himmelstjerna, G. (2010). Endoparasite control management on horse farm – lessons from worm prevalence and questionnaire data. *Equine Veterinary Journal*, 42(1): 79-83.
- Fukui, M. (1960). Studies on equine tapeworms and their intermediate hosts. *Anoplocephala perfoliata* Goeze 1782 and *Anoplocephala magna* Abildgaard 1789 and the experimental studies on the removal of these cestodes with bithionol. *Japanese Journal of Parasitology*, 9: 190-194.
- Garippa, G., Elisabetta, P., Sanna Passino, E., Pau, S., Columbano, N., Scanu, A., Caggiu, S., Deiana, R., Melosu, V., Manfredi, M.T. (2016). Risk factors of gastrointestinal parasites lungworms ticks and lice in donkeys in the Asinara National Park (Sardinia – Italy). In: Abstract Book, LXX Convegno Sisvet, pp. 258-259.
- Gasser, R.B., Hung, G.C., Chilton, N.B., Beveridge, I. (2004). Advances in developing molecular diagnostic tools for strongyloid nematodes of equids: fundamental and applied implications. *Molecular and Cellular Probes*, 18: 3-16.
- Gasser, R.B., Williamson, R.M.C., Beveridge, I., (2005). *Anoplocephala perfoliata* of horses – significant scope for further research, improved diagnosis and control. *Parasitology*, 131: 1–13.
- Gawor, J.J. (1995). The prevalence and abundance of internal parasites in working horses autopsied in Poland. *Veterinary Parasitology*, 58(1-2): 99-108.
- Gebreyohans, A., Abrhaley, A., Kebede, E. (2017). Prevalence of gastrointestinal helminthes of donkey in and around Mekelle. *Nature and Science*, 15(1): 42-57.
- Geering, R.R. e Johnson, P.J. (1990). Equine tapeworms more prevalent. *Veterinary Record*, 127(8): 220.
- Georgi, J.R. (1974). Parasitology for veterinarians (2nd ed) W.B. Saunders Co., Philadelphia.
- Getachew, A.M. (1999). Epidemiological study on the health and welfare of Ethiopian donkeys, with particular reference to parasitic disease. MVM thesis, University of Glasgow Veterinary School. Glasgow, Scotland, UK.
- Getachew, A. (2006). Endo parasites of working donkeys in Ethiopia. PhD thesis, University of Glasgow Veterinary School., UK.
- Getachew, A.M., Feseha, G., Trawford, A., Reid, S.W.J. (2008a). A survey of seasonal patterns in strongyle faecal worm egg counts of working equids of the central midlands and lowlands, Ethiopia. *Tropical Animal Health and Production*, 40: 637-642.
- Getachew, A.M., Innocent, G.T., Trawford, A.F., Feseha, G., Reid, S.J.W. and Love, S. (2008b). Equine parascariosis under the tropical weather conditions of Ethiopia: a coprological and postmortem study. *Veterinary Record*. 162: 177-180.
- Getachew, A.M., Trawford, A., Feseha G., Reid, S.W.J. (2010a). Gastrointestinal parasites of working donkeys of Ethiopia. *Tropical Animal Health and Production*, 42: 27-33.
- Getachew, A.M., Innocent, G.T., Trawford, A.F., Reid, S.W.J., Love., S (2010b). Epidemiological features of fasciolosis in working donkeys in Ethiopia. *Veterinary Parasitology*, 169(3-4): 335-339.
- Getachew, A.M., Innocent, G., Proudman, C.J., Trawford, A., Feseha, G., Reid, S.W.J., Faith, B., Love., S. (2012) Equine cestodosis: a sero-epidemiological study of *Anoplocephala perfoliata* infection in Ethiopia. *Veterinary Research Communications*, 36: 93-98.

- Getahun, T.K. e Kassa, T.Z. (2017). Prevalence and species of major gastrointestinal parasites of donkeys in Tenta Woreda, Amhara Regional State, Ethiopia. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health*, 9(2): 23-31.
- Giannetto S., Poglayen G., Brianti E. (2008). I parassiti dell'asina dall'immagine all'azione. In: L'asino all'attenzione della comunità scientifica e del territorio. A cura di Conte F., Chiriotti Ed. 32-36.
- Gibson, T.E. (1953). The effect of repeated anthelmintic treatment with phenothiazine on the fecal egg counts of housed horses, with some observation on the life cycle of *Trichonema* spp. in the horse. *Journal for Helminthology*, 27: 29-40.
- Giovannola, A. (1936). Energy and food reserves in the development of nematodes. *Journal of Parasitology*, 22: 207-218.
- Goday, C. e Pimpinelli, S. (1984). Chromosome organization and heterochromatin elimination in *Parascaris*. *Science* 224, 411–413.
- Goday, C. e Pimpinelli, S. (1986). Cytological analysis of chromosomes in the two species *Parascaris univalens* and *P. equorum*. *Chromosoma* 94:1–10. doi:10.1007/BF00293524.
- Goday, C. e Pimpinelli, S. (1989). Centromere organization in meiotic chromosomes of *Parascaris univalens*. *Chromosoma* 98:160–166. doi:10.1007/BF00329679.
- Goethe, R. e Heil, H.G. (1984). Internal parasites and lungworms of donkeys in Germany: age related evaluation of prevalence of infections and specific composition. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 91:144-145.
- Graber, M. (1970). Helminthes et helminthiases des équidés (ânes et chevaux) de a république du Tchad. *Revue d'élevage et médecine vétérinaire des pays tropicaux*, 23(2): 207-222.
- Gundlach, J.L., Sadzikowski, A.B., Tomczuk, K. (2003). Diagnosis of tapeworm infestation in horses. *Medycyna Weterynaryjna*, 59: 532–535.
- Gül, A., Değer, S., Ayaz, E. (2003). The prevalence of helminth species according to Faecal Examination in Equids in different cities in Turkey. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 27: 195-199.
- Haridy, F.M., Morsy, T.A., Gawish, N.I., Antonios, T.N., Gawad, A.G.E.A. (2002). The potential role of donkeys and horses in zoonotic fascioliasis in Gharbia Governorate, *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 32(2): 561-570.
- Hartewich, G. (1986). Zum *Strongylus tetracanthus* – Problem und zur Systematik der Cyathostominea (Nematoda: Strongyloidea). *Mitteilungen aus dem Zoologischen Museum in Berlin*, 62: 61-102.
- Hass, D.K. (1979). Equine parasitism. *Veterinary Medicine Small Animal Clinician*, 74: 980-988.
- Hasslinger, M.A. (1990) Oxyuriasis. *Sonderdruck Handlexikon Tierärztlichen Praxis*, 186: 639g–n.
- Hasslinger, M.A. e El-Seify, M.A. (1996). Paramphistomatid infestation in equids in Egypt. *Berliner und Munchener Tierärztliche Wochenschrift*, 106(6-7): 224-226.
- Hatch, C. (1966). *Fasciola hepatica* in donkeys. *Irish Veterinary Journal*, 20: 130.
- Hiepe, T., Nickel, S., Siebecke, F. (1975). Studies on the dynamics of *Strongyloides* egg release under stud conditions. *Folia Parasitologica (Praha)*, 22: 341–344.
- Hiko, A. e Mengesha, B. (2010). Equine helminthiasis in and around Assela, Arsi Zone of Oromia Regional State. *Bulletin of Animal Health and Production in Africa*, 58(4).

- Hinney, B., Wirtherle, N.C., Kyule, M., Miethe, N., Zessin, K.H., Clausen, P.H. (2011). Prevalence of helminths in horses in the State of Brandenburg, Germany.
- Hoglund, J., Ljungstrom, B., Nilsson, O., Ugglå, A. (1995). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to *A. perfoliata* in horse sera. *Veterinary Parasitology*, 59: 97-106.
- Hosseini, S.H., Meshgi, B., Eslami, A., Bokai, S., Sobhani, M., Ebrahimi Samani, R. (2009). Prevalence and biodiversity of helminth parasites in donkeys (*Equus asinus*) in Iran. *International Journal of Veterinary Research*, 3(2): 95-99.
- Ihle, J.E.W. (1922). The adult strongylids (Sclerostomes) inhabiting the large intestine of the horse. In: Rap. Com. Sclerostomiasis-onders Nederland. I. Zool. Gedeel, 1: 118.
- Ismail, A.A., Seri, H.I., Ahmed, N.K., El Tigani-Asil E.I. T.A., Bashar, A.E., Bakar, A.D. (2016). A survey of seasonal gastrointestinal parasitic infections in donkeys from a semiarid Sub-Saharan Region, Sudan. *Hindawi Journal Pathog*, p.8.
- Jacobs, D.E. (1986). Tapeworm infection – *Anoplocephala* spp. A colour atlas of equine parasites. Gower Publishing Ltd, London. pp. 5-16.
- Jajere, S.M., Lawal, J.R., Bello, A.M., Wakil, Y., Turaki, U.A., Waziri, I. (2016). Risk factors associated with the Occurrence of Gastrointestinal Helminths among Indigenous Donkeys (*Equus asinus*) in Northeastern Nigeria. *Scientifica*, Article ID 3735210. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/3735210>.
- Junquera, P. (2014). *Dictyocaulus* species, parasitic lungworms of Cattle, Sheep, Goats and other Livestock. Biology, prevention and control. *Dictyocaulus filaria, Dictyocaulus viviparus, Dictyocaulus arnfieldi*. In: Merck Veterinary Manual, Merck and Co, Inc, Whitehouse Station, N.J., USA, pp. 885-910.
- Kania, S.A. e Reinemeyer, C.R. (2005). *Anoplocephala perfoliata* coproantigen detection: a preliminary study. *Veterinary Parasitology*, 127: 115-119.
- Kjær, L.N., Lungholt, M.M., Nielsen, M.K., Olsen, S.N., Maddox-Hyttel, C. (2007). Interpretation of serum antibody response to *Anoplocephala perfoliata* in relation to parasite burden and faecal egg count. *Equine Veterinary Journal*: 39, 529-533.
- Kedir, A., Yosef, D., Nuraddis, I. (2017). Prevalence of equine helminthiasis in Gedeb Hasassa District, Arsi Zone, South Eastern Ethiopia. *Gloval Veterinaria*, 18(6): 406-413.
- Khallaayoune, K. (1991). Benefit of strategic deworming programme in working donkeys in Morocco. In: D. Fielding and R.A. Pearson (eds). Donkeys, mules and horses in tropical agricultural development. *Proceedings of colloquium*, 3-6 September, 1990. Edinburgh, Scotland. pp. 174-180.
- Khan, M.A., Roohi, N., Rana, M.A.A. (2015). Strongylosis in equines: a review. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 25(1): 1-9.
- Kheir, S.M. e Kheir, H.S.M. (1981). Gastrointestinal nematodes of equines in southern Darfur region of the Sudan. *Sudan Journal of Veterinary Research*, 3: 53-54.
- Klei, T.R., Öutk, A.M., McClure, J.R., Holmes, R.A., Dennis, V.A., Chapman, M.R. (1990). Effect of repeated *Strongylus vulgaris* inoculations and concurrent ivermectin treatments on mesenteric arterial lesions in pony foals. *American Journal of Veterinary Research*, 51: 654-660.
- Kotwal, S.K., Sharma, R.K., Kalita, G. (2000). Epidemiological studies on internal parasites of equines of cold arid regions of Ladakh. *Centaur*, 17: 39-41.

- Kuzmina, T.A., Kuzmin, Y.I., Kharchenko, V.A. (2006). Field study on the survival, migration and overwintering of infective larvae of horse strongyles on pasture in central Ukraine. *Veterinary Parasitology*, 141: 264-272.
- Kuzmina, T.A., Kharchenko, V.A., Zvegintsova, N.S. (2007). Comparative study of the intestinal strongylid communities of equidae in the Askania-Nova biosphere reserve, Ukraine. *Helminthologia*, 44(2): 62-69.
- Kuzmina, T.A. e Kuzmin, Yu.I. (2008). The community of strongylids (Nematoda, Strongylida) of working donkeys (*Equus asinus*) in Ukraine. *Vestnik zoologii*, 42(2): 99-104.
- Kuzmina, T.A., Lyons, E.T., Tolliver, S.C., Dzeverin, I.I., Kharchenko, V.A. (2012). Fecundity of various species of strongylids (Nematoda: Strongylidae) parasites of domestic horses. *Parasitology Research*, 111: 2265-2271.
- K'ung, F.Y. e Yang, N.H. (1964). Strongylid parasites of donkeys in Peking. III. *Cylicocyclus pekingensis* sp. n. *Acta Zoologica, Sin.*, 16: 393-397. (Chinese text, English summary).
- Laugier, C., Sevin, C., Menard, S. and Maillard, K. (2012). Prevalence of *Parascaris equorum* infection in foals on French stud farms and first report of ivermectin-resistant *P. equorum* populations in France. *Veterinary Parasitology*, 188: 185-189.
- Legese, Y. (1996). Preliminary survey on management aspects and health problem of donkey in Dire Dawa and East Oromia, Ethiopia, pp. 34.
- Leiper, R.T. (1911). Some new parasitic Nematodes from Tropical Africa. *Proceedings of the Zoological Society of London*, 2: 549-555.
- Lem, M.F., Vincent, K.P., Pone, J.W. and Joseph, T. (2012) Prevalence and intensity of gastro-intestinal helminths in horses in the Sudano-Guinean climatic zone of Cameroon. *Tropical Parasitology*, 2. 45-48.
- Lewa, A.K., Munyua, W.K., Ngatia, T.A., Maingi, N.E. (1998). The common internal parasites encountered in donkeys in Kiambu district (Kenya), their seasonal prevalence and the pathological lesions associated with them. *Proceedings of 3rd colloquy International sobre equidos de Trabajo*, 5-9 october. Mexico. pp. 169-177.
- Lewa, A.K., Ngatia, T.A., Munyua, W.K., Maingi, N.E. (1999). Comparison of haematological changes and strongyle faecal egg counts in donkeys in Kiambu district of Kenya. In Kaumbutho, P.G., Pearson, R.A., Simalenga, T.E. (eds) 2000. Empowering Farmers with Animal Traction. Proceedings of the workshop of the Animal Traction Network for Eastern and Southern Africa (ATNESA) held 20-24 September 1999. Mpumalanga. South Africa. p. 344. ISBN 0-907146-10-4.
- Lichtenfels, J.R. (1975). Helminths of domestic equids. Illustrated keys to genera and species with emphasis on North American forms. *Proceedings of The Helminthological Society of Washington* (special issue), 42: 1-92.
- Lichtenfels, J.R., McDonnell, A., Love, S., Matthews, J.B. (2001). Nematodes of the tribe Cyathostominae (Strongylidae) collected from horses in Scotland. *The Compendium on Parasitology*, 68: 265-269.
- Lichtenfels, J.R., Kharachenko, V.A., Dvojnjos, G. M. (2008). Illustrated identifications keys to strongylid parasites (strongylidae: Nematoda) of horses, zebras and asses (Equidae). *Veterinary Parasitology*, 156: 4-161.
- Lightbody, K.L., Davis, P.J., Austin, C.J. (2016). Validation of a novel saliva-based ELISA test for diagnosing tapeworm burden in horses. *Veterinary Clinical Pathology*, 45: 335-346.

- Lightbody, K.L., Matthews, J.B., Kemp-Symonds, J.G., Lambert, P.A., Austin, C.J. (2017). Use of saliva-based diagnostic test to identify tapeworm infection in horses in the UK. *Equine Veterinary Journal*, DOI: 10.1111/evj.12742.
- Lindberg, R. (1976). Överlevnad av infektiösa larver av hästens strongylida nematoder i betesgräs. *Svensk Veterinärtidning*, 28: 509-515 [In Swedish].
- Looss, A. (1900). Notizen zur Helminthologie Egyptens. III. Die Sclerostomen der Pferde und Esel in Egypten. *Zbl. Bact. Parasitenk. I. Abt. Orig.*, 27(50-160): 184-192.
- Looss, A. (1902). The Sclerostomidae of horses and donkeys in Egypt. *Rec Egypt Gov School Med. Cairo*, 25-139.
- Love, S. (1995). Recognizing disease associated with strongyles in horses. *Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian*, 564-567.
- Love, S. e Duncan, J. (1992). Development of cyathostome infection of helminth naïve foals. *Equine Veterinary Journal*, 13: 93-98.
- Love, S., Murphy, D., Mellor, D. (1999). Pathogenicity of cyathostome infection. *Veterinary Parasitology*, 85: 113-122.
- Lyon, S., Stebbings, H.C., Coles, G.C. (2000). Prevalence of tapeworms, bots and nematodes in abattoir horses in southwest England. *Veterinary Record*, 147: 456-457.
- Lyons, E.T., Drudge, T.H., Tolliver, S.C. (1976). Studies on the development and chemotherapy of larvae of *Parascaris equorum* (Nematoda: Ascaridoidea) in experimentally and naturally infected foals. *Journal of Parasitology*, 62: 453-459.
- Lyons, E.T., Tolliver, S.C., Drudge, J.H., Swerczek, T.W., Crowe, M.W. (1984). Prevalence of *A. perfoliata* and lesions of *D. megastoma* in thoroughbreds in Kentucky at necroscopy. *American Journal of Veterinary Research*, 45: 996-999.
- Lyons, E.T., Tolliver, S.C., Drudge, J.H., Swerczek, T.W., Crowe, M.W. (1985). Lungworms (*Dictyocaulus arnfieldi*): prevalence in live equids in Kentucky. *American Journal of Veterinary Research*, 46(4): 921-923.
- Lyons, E.T., Tolliver, S.C., Drudge, J.H., Granstrom, D.E., Collins, S.S. (1993). Natural infections of *Strongyloides westeri*: prevalence in horse foals on several farms in central Kentucky in 1992. *Veterinary Parasitology*, 50: 101-107.
- Lyons, E.T., Tolliver, S.C., Collins, S.S. (2006). Prevalence of large endoparasites at necroscopy in horses infected with a Population B small strongyle in a herd established in Kentucky in 1966. *Parasitology Research*, 99: 114-118.
- Lyons, E.T., Tolliver, S.C. and Collins, S.S. (2007) Study (1991 to 2001) of drug-resistant Population B small strongyles in critical tests in horses in Kentucky at the termination of a 40-year investigation. *Parasitology Research*, 101: 689-701.
- Lyons, E.T. e Tolliver, S.C. (2014). *Strongyloides westeri* and *Parascaris equorum*: Observations in field studies in Thoroughbred foals on some farms in Central Kentucky, USA. *Helminthologia*, 51: 7-12.
- M.A.F.F.: Manual of veterinary parasitological laboratory techniques, 1986.
- Mair, T.S. e Pearson, G.R. (1995). Multifocal non-strangulating intestinal infarction associated with larval cyathostomiasis in a pony. *Equine Veterinary Journal*, 27: 154-155.
- Mair, T.S., Sutton, D., Love, S. (2000). Caeco-caecal intussusception in cyathostomosis. *Equine Veterinary Journal*, 32: 77-80.

- Malan, F.S., de Vos, V., Reineke, R.K., Pletcher, J.M. (1982). Studies on *Strongylus asini*. I. Experimental infestation of equines. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 49: 151-153.
- Marinković, D., Aleksić-Kovačević, S., Kristić V., Knežević, M. (2009). Morphological findings in the cranial mesenteric artery of horses with verminous arteritis. *Acta Veterinaria*, 59(2). DOI: 10.2298/AVB0903231M.
- Mansfield, L. S., Alavi, A., Wortman, J. A., Schad, G. (1995). Gamma camera scintigraphy for direct visualization of larval migration in *Strongyloides stercoralis*-infected dogs. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 52: 236–240.
- Mas-Coma, M.S., Bargues, M.D., esteban J.G. (1999). Human fasciolosis. In: Dalton, J.P. (ed). Fasciolosis. CAB International, Oxon. pp. 411-432.
- Mathee, S., Krecek, R.C., Milne, A.S. (2002). Prevalence and biodiversity of helminth parasites in donkeys in South Africa. *Journal of Parasitology*, 86(4): 756-762.
- Matthews, J.B. (2002). Parasitic airways disease. In: Equine Respiratory Disease, Lekeux, P. (ed.). International Veterinary Information Service, Ithaca, New York, USA.
- Matthews, J.B. (2008). An update on cyathostomins: anthelmintic resistance and worm control. *Equine Veterinary Education*, 20: 552–560.
- Matthews, J.B. (2014). The future of helminth control in horses. *Equine Veterinary Journal*, 46: 10–11.
- Matthews, J.B. e Burden, F.A. (2013). Common helminth infections of donkeys and their control in temperate regions. *Equine veterinary Education*, DOI: 10.1111/eve.12018.
- Mattioli, R., Zinsstag, J., Pfister, K. (1994). Frequency of trypanosomosis and gastrointestinal parasites in draught donkey in The Gambia in relation to animal husbandry. *Journal of Tropical Animal Health and Production*, 26: 102-108.
- Maxie, M.G. e Robinson, W.F. (2007). Cardiovascular System. In: Jubb, K.V.F., Kennedy, P.C., Palmer, N.: Pathology of domestic Animals, fifth edition. Vol. 3, editor Maxie M.G., Saunders Elsevier, 89-91.
- Mayhew, I.G., Brewer, B.D., Reinhard, M.K., Greiner, E.C. (1984). Verminous (*Strongylus vulgaris*) myelitis in a donkey. *The Cornell veterinarian*, 74: 30-37.
- McCraw, B.M. e Slocombe, J.O.D. (1976). *Strongylus vulgaris* in the horse: a review. *Canadian Veterinary Journal*, 17: 150-157.
- Meana, A., Luzon, M., Corchero, J., Gómez-Bautista, M. (1998). Reliability of coprological diagnosis of *Anoplocephala perfoliata* infection. *Veterinary Parasitology*, 74: 79-83.
- Meana, A., Pato, N.F., Martin, R., Mateos, A., Perez-Garcia, J., Luzon, M. (2005). Epidemiological studies on equine cestodes in central Spain: infection pattern and population dynamics. *Veterinary Parasitology*, 130: 233-240.
- Medica, D.L. e Sukhdeo, M.V.K. (1997). Role of lipids in the transmission of the infective stage (L3) of *Strongylus vulgaris* (Nematoda: Strongylida). *Journal of Parasitology*, 83(5): 775-779.
- Mezgebu, T, Tafess, K, Tamiru, F. (2013). Prevalence of gastrointestinal parasites of horses and donkeys in and around Gondar Town, Ethiopia. *Open Journal of Veterinary Medicine*, 3: 267-272.
- Mfitilodze, M.W. e Hutchinson, G.W. (1987). Development of free-living stages of equine strongyle in faeces on pasture in a tropical environment. *Veterinary Parasitology*, 26: 285-296.

- Mfitilodze, M.W. e Hutchinson, G.W. (1989). Prevalence and intensity of non-strongyle intestinal parasites of horses in northern Queensland. *Australian Veterinary Journal*, 66: 23–26.
- Mirck, M. H. (1977). *Strongyloides westeri* Ihle, 1917 (Nematoda: Strongyloididae). I. Parasitological features of natural infection. *Tijdschrift Diergeneeskunde*, 102, 1039–1043.
- Mirck, M.H. e Franken, P. (1978). *Strongyloides westeri* Ihle, 1917 (Nematoda: Strongyloididae). II). Parasitological and haematological features of experimental infection. *Tijdschrift Diergeneeskunde*, 103: 355–360.
- Mohamee, A., Hailemariam, K., Yimer, M. (2017). Major gastrointestinal parasites of donkey in and around Jigjiga, Somali Region, Ethiopia. *Advances in Biological Research*, 11(3): 144-149.
- Molin, R. (1861). Il Sottordine degli Acrofalli ordinato scientificamente secondo i risultamenti delle indagini anatomiche ed embriologiche. *Istituto Veneto di Scienze, lettere ed arti*. Venezia, 9: 427-633.
- Moore, A.J. (2012). Assessment of Sustainable Methods of Cyathostomin Control at The Donkey Sanctuary Devon.
- Morales, M.A., Luengo, J., Vasquez, J. (2000). Distribution and prevalence of fascioliasis in meat animals in Chile, 1989-1995. *Parasitologia Al Dia*, 24(3-4): 115-118.
- Morrow, L.D., Smith, K.C., Piercy, R.C., du Toit, N., Burden, F.A., Olmos, G., Gregory, N.G., Verheyen, K.L.P. (2011). Retrospective analysis of *post mortem* findings in 1,444 aged donkeys. *Journal of Comparative Pathology*, 144: 145-156.
- Mulate, B. (2005). Preliminary study on helminthosis of equine in South and North Wollo Zone, Ethiopia. *Veterinary Journal*, 9(2): 27-29.
- Müller, O.F. (1970). *Zoologiae Danicae seu animalium Daniae et Norvegiae rariorum ac minus notorum icones*. Havniae. 124 pp.
- Murphy, D., Keane, M.P., Chandler, K.J., Goulding, R. (1997). Cyathostome associated disease in the horse: investigation and management of four cases. *Equine Veterinary Education*, 9: 247-252.
- Mushi, E. Brinta, M., Chabo, R., Monnafela, L. (2003). Seasonal fluctuation of parasitic infection in donkeys (*Equus asinus*) in Oodi village, Kgatleng District, Botswana. *Journal of the South African Veterinary Association*, 74: 24-26.
- Nakayima, J., Kabasa, W., Aleper, D., Okidi, D. (2017). Prevalence of endo-parasites in donkeys and camels in Karamoja sub-region, North-eastern Uganda. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health*, 9(1): 11-15.
- Nansen, P., Andersen, S. e Hesselholt, M. (1975). Experimental infection of horses with *Fasciola hepatica*. *Experimental Parasitology*, 37(1): 15-19.
- Negasa, T., Dilbato, T., Gudeta, D. (2017). Cross-sectional study on equine lung worm and associated risk factor in Ambo District, Oromia Region, Ethiopia. *International Journal of Research Granthaalayah*, 5(5): 312-318.
- Netherwood, T., Wood, J.L., Townsend, H.G., Mumford, J.A., Chanter, N. (1996). Foal diarrhoea between 1991 and 1994 in the United Kingdom associated with *Clostridium perfringens*, rotavirus, *Strongyloides westeri* and *Cryptosporidium* spp. *Epidemiology of Infections*, 117: 375–383.
- Nielsen, M.K. (2015a). Evidence-based considerations for control of *Parascaris* spp. infections in horses. *Equine Veterinary Education*, doi. 10.1111/eve.12536.

- Nielsen, M.K. (2015b). Equine tapeworm infections: Disease, diagnosis and control. *Equine Veterinary Education*, doi: 10.1111/eve.12394.
- Nielsen, M.K., Monard, J., Olsen, S.N. (2006). Prescription –only anthelmintics- a questionnaire surveillance and control of equine strongyles in Denmark. *Veterinary Parasitology*, 135: 47-55.
- Nielsen, M.K., Kaplan, R.M., Thamsborg, S.M., Monrad, J., Olsen, S.N. (2007). Climatic influences on development and survival of free-living stages of equine strongyles: implications for worm control strategies and managing anthelmintic resistance. *Veterinary Journal*, 174(1): 23-32.
- Nielsen MK, Peterson DS, Monrad J, Thamsborg SM, Olsen SN, Kaplan R.M. (2008). Detection and semi-quantification of *Strongylus vulgaris* DNA in equine faeces by real-time quantitative PCR. *International Journal for Parasitology*, 38(3–4): 443–453.
- Nielsen, M.K., Baptiste, K.E., Tolliver, S.C., Collins, S.S., Lyons, E.T. (2010). Analysis of multiyear studies in horses in Kentucky to ascertain whether counts of eggs and larvae per gram of feces are reliable indicators of numbers of strongyles and ascarids present. *Veterinary Parasitology*, 174: 77-84.
- Nielsen, M.K., Mittel, L., Grice, A., Erskine, M., Graves, E., Vaala, W., Tully, R.C., French, D.D., Bowman, R., Kaplan, R.M. (2013). AAEP Parasite Control Guidelines. *American Association of Equine Practitioners*. On-line at www.aaep.org.
- Nielsen, M.K., Donoghue, E.M., Stephens, M.L., Stowe, C.J., Donecker, J.M. and Fenger, C.K. (2015). An ultrasonographic scoring method for transabdominal monitoring of ascarid burdens in foals. *Equine Veterinary Journal*, doi: 10.1111/evj.12478. [Epub ahead of print].
- Nielsen, M.K., Jacobsen, S., Olsen, S.N., Bousquet, E., Pihl, T. (2016a). Nonstrangulating intestinal infarction associated with *Strongylus vulgaris* in referred Danish equine cases. *Equine Veterinary Journal*, 48(3): 376-379.
- Nielsen, M.K., von Samson-Himmelstjerna, G., Pfister, K., Reinemeyer, C.R., Molento, M.B., Peregrine, A.S., Hodgkinson, J.E., Jacobsen, K., S., R.M., Matthews, J.B. (2016b). The appropriate antiparasitic treatment; coping with emerging threats from old adversaries. *Equine Veterinary Journal*. in press.
- Nielsen, M.K. e Lyons, E.T. (2017). Encysted cyathostomin larvae in foals – progression of stages and the effect of seasonality. *Veterinary Parasitology*, 236: 108-112.
- Nilsson, O., Ljungstrom, B.L., Høglund, J., Lundquist, H., Ugglå, A. (1995). *Anoplocephala perfoliata* in horses in Sweden: prevalence, infection levels and intestinal lesions. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 36: 319-328.
- Nuraddis, I., Berhanu, T., Deressa, B., Tolosa, T. (2011). Survey of prevalence of helminth parasites of donkeys in and Around Hawassa Town, Southern Ethiopia. *Global Veterinaria*, 6(3): 223-227.
- Ogbourne, C.P. (1972). Observations on the free-living stages of strongylid nematodes of the horses. *Parasitology*, 64: 461-477.
- Ogbourne, C.P. (1975). Epidemiological studies on horses infected with nematodes of the family Trichonematidae. *International Journal for Parasitology*, 5: 667-720.
- Oryan, A., Kisz, F.R., Rajabloo, M. (2015). Larval cyathostominosis in a working donkeys. *Journal of Parasitic Diseases*, 39(2): 324-327.
- Osterman Lind, E. (2005). Prevalence and control of strongyle nematode infections of horses in Sweden. *Doctoral thesis*. ISSN 1652-6880, ISBN 91-576-7028-5.

- Ottaway, C.W. e Bingham, M.L. (1946). Further observations on the incidence of parasitic aneurysm in the horse. *Veterinary Record*, 58: 155-159.
- Owen, J.R. (1977). Liver fluke infection in horses and ponies. *Equine Veterinary Journal*, 9(1): 29-31.
- Owen, J.R., Jagger, R., Quan-Taylor, D.W. (1988). Prevalence of *A. perfoliata* in horses and ponies in Clwyd, Powys and adjacent English marshes. *Veterinary Record*, 123: 562-563.
- Owen, J.R., Jagger, R., Quan-Taylor, D.W. (1989). Caecal intussusceptions in horses and the significance of *Anoplocephala perfoliata*. *Veterinary Record*, 124: 34-37.
- Pacifico, L., Buono, F., Neola, B., Piantedosi, D., Caraccio di Brienza, V., Brignolo, A., Roncoroni, C., Fagiolo, A., Veneziano, V. (2016). A coprological survey on the principal endoparasitic infections in horses in Italy. In: Poster e Abstract Book, XXII Congresso Multisala SIVE - Milano, 14-15 ottobre 2016. pp. 337-338.
- Painer, J., Kaczensky, P., Ganbaatar, O., Huber, K., Walzer, C. (2011). Comparative parasitological examination on sympatric equids in the Great Gobi "B" Strictly Protected Area, Mongolia. *European Journal of Wildlife Research*, 57(2): 225-232.
- Pandey, V. (1980). Epidemiological observations on lungworms, *Dictyocaulus arnfieldi*, in donkeys from Morocco. *Journal of Helminthology*, 54: 275-279.
- Pankhurst, J.W. (1963). Liver flukes in donkeys. *Veterinary Record*, 75(10): 434.
- Parsani, H.R., Momin, R.R., Lateef, A., Das, H. (2013). Studies on gastro-intestinal helminths of *Equus acinus* in North Gujarat, India. DOI: 10.4314/ejb.v15i1.2.
- Pavone, S., Veronesi, F., Fioretti, D.P., Mandara, M.T. (2010). Pathological changes caused by *Anoplocephala perfoliata* in the equine ileocecal junction. *Veterinary Research Communication*, 34(1): S53-S56.
- Pavone, S., Veronesi, F., Genchi, C., Piergilli Fioretti, D., Brianti, E., Mandara, M.T. (2011). Pathological changes caused by *Anaplocephala perfoliata* in the mucosa/submucosa and in the enteric nervous system of equine ileocecal junction. *Veterinary Parasitology*, 176(1): 43-52.
- Peregrine, A.S., Molento, M.B., Kaplan, R.M., Nielsen, M.K. (2014). Anthelmintic resistance in important parasite of horses: Does it really matter? *Veterinary Parasitology*, 201 (1-2): 1-8.
- Pereira, J.R. e Vianna, S.S. (2006). Gastrointestinal parasitic worms in equines in the Paraiba Valley, State of Sao Paulo, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 140(3-4): 289-95.
- Perler, L., Gottstein, B., Borioli, A. (1997). Fascioliasis in horses: practical approach. *Pratique Veterinaire Equine*, 29(3): 159-161.
- Pilo, C., Altea, A., Pirino, S., Nicolussi, P., Varcasia, A., Genchi, M., Scala, A. (2012). *Strongylus vulgaris* (Loos, 1900) in horses in Italy: is it still a problem? *Veterinary Parasitology*, 124(2-4): 161-167.
- Pilliner, S. e Davie, Z. (1996). Equine science, health and performance. Black-well Science Ltd. Oxford, London, Uk. pp. 262-263.
- Poynter, D. (1960). The arterial lesions produced by *Strongylus vulgaris* and their relationship to the migratory route of the parasite in its host. *Research in Veterinary Science*, 1: 205-217.
- Probstmayr, W. (1865). *Oxyuris vivipara*. Wchnschr. f. Thierh. u. Viehzucht, Augsburg, 9(23): 178-180.
- Proudman, C.J. e Edwards, G.B. (1992). Validation of a centrifugation/flotation technique for the diagnosis of equine cestodiasis. *Veterinary Record*, 131:71-72.

- Proudman, C.J., Swan, J.D., Trees, A.L. (1995). Efficacy of pyrantel embonate and praziquantel against the equine tapeworm *Anoplocephaloides mamillana*. *Veterinary Record*, 137:45-46.
- Proudman, C.J. e Trees, A.J. (1996). Use of excretory/secretory antigens for the serodiagnosis of *Anoplocephala perfoliata* cestodosis. *Veterinary Parasitology*, 61(3-4): 239-247.
- Proudman, C.J. e Trees, A.J. (1999). Tapeworms as a cause of intestinal disease in horses. *Parasitology Today*, 15(4): 156-159.
- Proudman, C.J. e Holdstock, N.B. (2000). Investigation of an outbreak of tapeworm associated colic in a training yard. *Equine Veterinary Journal Supplement*, 32: 37-41.
- Proudman, C.J. e Matthew, J.B. (2000). Control of Intestinal Parasites in Horses. *In Practice*, 22: 90-97.
- Quiel, G. (1919). *Poteriostomum* n.g. eine neue beim Pferde parasitierende Nematodengattung. *Zbl. Bact. Parasitenk. I. Abt. Orig.*, 83: 466-472.
- Railliet, A. & Henry, A. (1902). Sur les sclérostomien des équidés. *C.R. Societe de Biologie*, 54: 110-112.
- Ransom, B.H. (1907). *Probstmayria vivipara* (Probstmayr, 1865) Ransom, 1907, a nematode of horses heretofore unreported from the United States. Early Journal Content on JSTOR.
- Rebhein, S., Lindner, T., Visser, M., Winter, R. (2011). Evaluation of a double centrifugation technique for the detection of *Anoplocephala* eggs in horse faeces. *Journal of Helminthology*, 85: 409-414.
- Rebhein, S., Visser, M., Winter, R. (2013). Prevalence, intensity and seasonality of gastrointestinal parasites in abattoir horses in Germany. *Parasitology Research*, 112: 407-413.
- Regassa, A. e Yimer, E. (2013). Gastrointestinal parasites of equine in South Wollo Zone, North Eastern Ethiopia. *Global Veterinaria*, 11(6): 824-830.
- Reinemeyer, C.R. (2009). Controlling Strongyle Parasites of Horses. A mandate for Change 352 Special Lectures. 55. AAEP Proceedings.
- Reinemeyer, C.R. e Nielsen, M.K. (2013). *Handbooks of Equine Parasite Control*. Wiley-Blackwell.
- Reinemeyer, C.R. e Nielsen, M.K. (2014). Review of the biology and control of *Oxyuris equi*. *Equine Veterinary Education*, doi: 10.1111/eve.12218.
- Relf, V.E., Morgan, E.R., Hodgkinson, J.E., Matthews, J.B. (2013). Helminth egg excretion with regard to age, gender and management practices on UK Thoroughbred studs. *Parasitology*, 140: 641-652.
- Ricci, N. e Sabatini, A. (1992). Reports on helminth parasites of caecum and colon of equids in Italy. *Parasitologia (Roma)*, 34(1/2/3), 53-60.
- Rode, B. e Jorgensen, R.J. (1989). Baermannization of *Dictyocaulus* spp. from faeces of cattle, sheep and donkeys. *Veterinary Parasitology*, 30: 205-211.
- Rodriguez-Bertos, A., Corchero, J., Castano, M., Pena, L., Luzon, M. (1999). Pathological alterations caused by *Anoplocephala perfoliata* infection in the ileocaecal junction of equids. *Journal of Veterinary Medicine*, 46: 61-269.
- Rogers, R.A. (1956). A study of eggs of *Ascaris lumbricoides* var. *suum* with the electron microscope. *The Journal of Parasitology*, 42(2): 97-108.

- Roncoroni, C., Fagiolo, A., Amoruso, C., De Liberato, C. (2017). *Anoplocephala* sp. (Cestoda, Cyclophyllidae) infection in horses in Central Italy. *Veterinaria Italiana*, 53(1): 85-87.
- Rose, F.R. e Hodgson, R.D.S. (2000). Manual of Equine practice. (2nd ed.), USA, Saunders, pp. 224.
- Round, M.C. (1969). The prepatent period of some horse nematodes determined by experimental infection. *Journal of Helminthology*, 43: 185-192.
- Round, M.C. (1972). A study of the natural history of lungworm infection of equidae. In: Phd Thesis, University of Cambridge.
- Round, M.C. (1976). Lungworm infection (*Dictyocaulus arnfieldi*) of horses and donkeys. *Veterinary Record*, 99: 393-395.
- Russell, A.F. (1948). The development of helminthiasis in thoroughbred foals. *Journal of Comparative Pathology*, 58: 107-127.
- Ryu, S.H., Bak, U.B., Kim, J.G., Yoon, H.J., Seo, H.S., Kim, J.T., Park, J.Y., Lee, C.W. (2001). Cecal rupture by *Anoplocephala perfoliata* infection in a thoroughbred horse in Seoul Race Park, South Korea. *J. Veterinary Sciences*, 2: 189-193.
- Ryu, S., Jang, J., Bak, U., Lee, C., Youn, H., Lee, Y.L. (2004). Gastrointestinal impaction by *Parascaris equorum* in a thoroughbred foal in Jeju, Korea. *Journal of Veterinary Science*, 5: 181-182.
- Sathiyamoorthy, A., Vivek, S., Selvaraju, G., Palanivel, K.M. (2016). Study of endoparasitic infection in donkeys – A report. *International Journal of Science, Environment and Technology*, 5(6): 4545-4549.
- Saul, C., Siefert, L., Opuda-Asibo, J. (1997). Disease and health problems of donkeys: a case study from eastern Uganda. *Proceeding for the Reader for ATNESA workshop*, 5-9 may, 1997. Debre Zeit, Ethiopia.
- Scala, A. e Cancedda, M. (1996). Fattori limitanti la sopravvivenza dei cavallini “selvatici” della Giara (Sardegna): le endoparassitosi. *Supplementi di Ricerca di Biologia della Selvaggina*, 24: 111-117.
- Scala, A., Montanaro, S., Pintori, A. (2001). Epidemiologia delle infestazioni da anaplocefalidi negli equini in Sardegna. *Atti LV Convegno Nazionale SISVET*, 197-198.
- Seri, H.I., Hassan, T., Salih, M.M., Abakar, A.D. (2004). A survey of Gastrointestinal Nematodes of Donkeys (*Equus asinus*) in Khartoum State, Sudan. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 3(11): 736-739.
- Seyoum, Z., Tesfaye, M., Derso, S. (2015). Prevalence, intensity and risk factors of infestation with major gastrointestinal nematodes in equines in and around Shashemane, Southern Ethiopia. *Tropical Animal Health and Production*, 47(8): 1515-1521.
- Sheferaw, D. e Alemu, M. (2015). Epidemiological study of gastrointestinal helminths of equines in Damot-Gale district, Wolaita zone, Ethiopia. *Journal of Parasitic Diseases*, 39(2): 315-320.
- Shoop, W.L., Michael, B.F., Eary, C.F., Haines, H.W. (2002). Transmammary transmission of *Strongyloides stercoralis* in dogs. *Journal of Parasitology*, 88: 536-539.
- Shrikhande, G.B., Rewatkar, S.G., Deshmukh, S.S., Maske, D.K., Raghorte, Y.M. (2009). The Incidence of Helminth Parasites in Donkeys. Department of Epidemiology and Preventive Medicine. *Veterinary World*, 2(6): 224.

- Skotarek, S.L., Colwell, D.D., Goater, C.P. (2010). Evaluation of diagnostic techniques for *Anoplocephala perfoliata* in horses from Alberta, Canada. *Veterinary Parasitology*, 172: 249-255.
- Slivinska, K., Gawor, J., Jaworski, Z. (2009). Gastro-intestinal parasites in yearlings of wild Polish primitive horses from the Popielno Forest Reserve, Poland. *Helminthologia*, 46: 9-13.
- Slocombe, J.O.D. (1979). Prevalence and treatment of tapeworms in horses. *Canadian Veterinary Journal*, 20: 36-140.
- Slocombe, J.O.D. (2004). A modified critical test for the efficacy of pyrantel pamoate for *Anoplocephala perfoliata* in equids. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 68: 112-117.
- Slocombe, J.O.D. (2006). A modified critical test and its use in two dose titration trials to assess efficacy of praziquantel for *Anoplocephala perfoliata* in equids. *Veterinary Parasitology*, 136:127-135
- Slocombe, J.O.D. e McCraw, B.M. (1973). Gastrointestinal nematodes in horses in Ontario. *Canadian Veterinary Journal*, 14: 101-105.
- Slocombe, J.O.D., Valenzuela, J., Lake, M.C. (1987). Epidemiology of strongyles in pony in Ontario. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 51: 470-474.
- Smith, H.J. (1976a). Strongyle infections in ponies. I. Response to intermittent thiabendazole treatments. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 40: 327-333.
- Smith, H.J. (1976b). Strongyle infections in ponies. I. Reinfection of treated animals. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 40: 334-340.
- Smith, H.J. (1979). *Probstmayria vivipara* Pinworms in Ponies. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 43: 341-342.
- Solomon, T., Bogale, B., Chanie, M., Melaku, A. (2012). Occurrence of lungworm infection in Equines and their associated risk factors. *Global Veterinaria*, 8(1): 35-38.
- Sotiraki, S., Badouvas, A., Himonas, C. (1997). A survey on the prevalence of internal parasites of equines in Macedonia and Thessalia-Greece. *Journal of Equine Veterinary Science*, 17: 550-552.
- Soulsby, E.J.L. (1965a). Textbook of Veterinary Clinical Parasitology. Volume 1. Helminths. Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Soulsby, E.J.L. (1965b). Cestodes of horses. textbook of Veterinary Clinical Parasitology, Vol 1. FA Davis Co., Philadelphia.
- Soulsby, E.J.L. (1968). Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals. Bailliere, Tindall and Cassell. London, UK. pp 96.
- Soulsby, E.J.L. (1982). Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals (7th ed.). Ballière Tindall. London, UK.
- Soulsby, E.J.L. (1986). Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals (7th ed.). Ballière Tindall. Eastbourne. p 809.
- Southwood, L.L., Baxter, G.M., Bennet, D.G., Ragle, C.A. (1998). Ascarid impaction in young horses. *Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian*, 20(1): 100-106.
- Spasskii, A.A. (1951). Anoplocephalate tapeworms of domestic and wild animals. *Osnovy Tsestodologii*, Vol. 1. Akad. Nauk. SSSR, Moscow. pp. 730.
- Srihakim, S. & Swerczek, T.W. (1978). Pathologic changes and pathogenesis of *Parascaris equorum* infection in parasite-free pony foals. *American Journal of Veterinary Research*, 39(7): 1155-1160.

- Swerczek, T.W., Nielsen, S.W., Helmboldt, C.F. (1971). Transmammary passage of *Toxocara cati* in the cat. *American Journal of Veterinary Research*, 32(1): 89-92.
- Takele, B., e Nibret, E. (2013). Prevalence of gastrointestinal helminthes of donkeys and mules in and around Bahir Dar, Ethiopia. *Ethiopian Veterinary Journal*, 17(1): 13-30.
- Tavassoli, M., Arjmand, J., Hajipour, N. (2016). A survey on the prevalence of strongyles species in working donkeys in North-West of Iran. *Journal of Parasitic Diseases*, 40(4): 1210-1212.
- Tesfu, N., Asrde, B., Abebe, R., Kasaye, S. (2014). Prevalence and risk factors of gastrointestinal nematode parasites of horse and donkeys in Hawassa Town, Ethiopia. *Journal Veterinary Science & Technology*, doi:10.4172/2157-7579.1000210.
- Thamsborg, S.M., Ketzis, J., Horii, Y., Matthews, J.B. (2017). *Strongyloides* spp. infection of veterinary importance. *Parasitology*, 144: 274-284.
- Teixeira, W.F., Felippelli, G., Cruz, B.C., Maciel, W.G., Fávero, F.C., Gomes, L.V., Buzzulini, C., Prando, L., Bichuette, M.A., Lopes, W.D., Oliveira, G.P., Costa, A.J. (2014). Endoparasites of horses from the Formiga city, located in center-west region of the state of Minas Gerais, Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, 23: 534-538.
- Todd, A.C. e Doherty, L.P. (1951). Treatment of ascariasis in horses in central Kentucky. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 119: 363.
- Tomczuk, K., Kostro, K., Szczepaniak, K.O., Grzybek, M., Studzinska, M., Demkowska-Kutrzepa, M., Roczen-Karczmarz, M. (2014). Comparison of the sensitivity of coprological methods in detecting *Anoplocephala perfoliata* invasions. *Parasitology Research*, 113, 2401-2406.
- Tomczuk, K., Kostro, K., Grzybek, M., Szczepaniak, K., Studzinska, M., Demkowska-Kutrzepa, M., Roczen-Karczmarz, M. (2015). Seasonal changes of diagnostic potential in the detection of *Anoplocephala perfoliata* equine infections in the climate of Central Europe. *Parasitology Research*, 114: 767-772.
- Torgerson, P. e Claxton, J. (1999). Epidemiology and control. In: Dalton, J.P. (ed). Fasciolosis. CAB International. Oxon. pp. 113-149.
- Traversa, D., Milillo, P., Barnes, H., von Samson-Himmelsjerna, G., Schurmann, S., Demelr, J., Otranto, D., Lia, R.P., Perrucci, S., Frangipane di Regalbono, A., Beraldo, P., Amodie, D., Rohn, K., Cobb, R., Boeck, A. (2010). Distribution and species-specific occurrence of cyathostomins (Nematoda, Strongylida) in naturally infected horses from Italy, United Kingdom and Germany. *Veterinary Parasitology*, 168(1-2): 84-92.
- Trawford, A.F. e Tremlett, J.G. (1996). Efficacy of triclabendazole against *Fasciola hepatica* in the donkey (*Equus asinus*). *Veterinary Record*, 139: 142-143.
- Trentini A., Stancampiano L., Usai F., Micagni G., Poglayen G. (2010). Donkey endoparasites in an organic farm. *Parassitologia*, 52: 336.
- Tschojjo, U. (1957). Parasitic worms of Mongolian National Republic. Theses of Canadian Vet. Sci. Diss. Moscow (in Russian).
- Tzelos, T. e Matthews, J.B. (2016). Anthelmintic resistance in equine helminths and mitigating its effects. *In Practice*, 38: 489-499.
- Umur, Ş. & Açıci, M. (2009). A survey on helminth infections of equines in the Central Black Sea region, Turkey. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 33(5): 373-378.

- Urquhart, G.M., Armour, J., Duncan, J.L., Dunn, A.M., Jennings, F.W. (1996). *Veterinary Parasitology* (2nd ed.). Black Well Science Ltd. Oxford and London, UK.
- Uslu, U. e Guçlu, F. (2007). Prevalence of endoparasites in horses and donkeys in Turkey. *Bulletin of the Veterinary Journal Institute in Pulawy*, 51: 237-240.
- Valdéz-Cruz, M.P., Hernández-Gil, M., Galindo-Rodríguez, L., Alonso-Díaz, M.A. (2013). Gastrointestinal nematode burden in working equids from humid tropical areas of central Veracruz, Mexico, and its relationship with body condition and haematological values. *Tropical Animal Health and Production*, 2: 603-607.
- Van Beneden, E. (1883) Recherches sur la Maturation de L'Oeuf, la Fécondation et la Division Cellulaire (Gand, Leipzig, Paris).
- Veneziano V. (2011). I principali endoparassiti dell'asino: biologia e controllo. In Latte di asina produzione, caratteristiche e gestione dell'azienda asinina. Edito a cura della Fondazione iniziative Zooprofilattiche – Brescia, 82: 75-90.
- Vercruyse, J., Hris, E.A., Kaboret, Y.Y., Pangui, L.J., Gibson, D.I. (1986). Gastrointestinal helminths of donkeys in Burkina Faso. *Zeitschrift fur Parasitenkunde*, 72: 821-825.
- Veronesi, F., Diaferia, M., Piergili Fioretti, D. (2008). Infestazione da *Anoplocephala perfoliata* e manifestazioni cliniche nel cavallo. *Atti LXII Convegno Nazionale SISVET*, 177-178.
- Veronesi, F., Diaferia, M., Piergili Fioretti, D. (2009). *Anoplocephala perfoliata* infestation and colics in horses. *Veterinary Research Communication*, 33(1): 161-163.
- Vlaminck, J., Nejsun, P., Vangroenweghe, F., Thamsborg, S.M., Vercruyse, J., Geldhof, P. (2012). Evaluation of a serodiagnostic test using *Ascaris suum* haemoglobin for the detection of roundworm infections in pig populations. *Veterinary Parasitology*, 189: 267-273.
- Wako, G., Buro, B., Mohammed, J., Ousman, A., Ebrahim, K., Hasen, M., Abdurahaman, M. (2016). Prevalence of major gastrointestinal parasites in donkeys in Dodola District, West Arsi, Oromia Regional State, Ethiopia. *World Journal of Agricultural Sciences*, 12(2): 119-124.
- Wannas, H.Y., Dawood, Kh. A., Gassem, Gh. A. (2012). Prevalence of Gastro-intestinal Parasites in Horses and Donkeys in Al Diwanayah Governorate. *AL-Qadisiya Journal of Veterinary Medicine Science*, 11 (1): 841-855.
- Wells, D., Krecek, R., Wells, M., Guthrie, A., Lourens, J. (1998). Helminth levels of working donkeys kept under different management systems in the Moretele 1 district of the North-West Province, South Africa. *Journal of Veterinary Parasitology*, 77: 163-177.
- Wetzel, R. & Enigk, K. (1938). In: *Advances in Parasitology*, Ben Dawes, London, New York, San Francisco. Volume 14, pp. 365.
- Wharton, D. (1980). Nematode egg-shells. *Parasitology*, 81(2): 447-463.
- WHO (1995). Control of foodborne trematodes infections. Technical report series 849.
- Williamson, R.M.C., Gasser, R.B., Middleton, D., Beveridge, I. (1997). The distribution of *Anoplocephala perfoliata* in the intestine of the horse and associated pathological changes. *Veterinary Parasitology*, 73: 225-241.
- Williamson, R.M., Beveridge, I., Gasser, R.B. (1998). Coprological methods for the diagnosis of *Anoplocephala perfoliata* infection of the horse. *Australian Veterinary Journal*, 76: 618-621.

- Wolf, D., Hermosilla, C.; Taubert, A. (2014). *Oxyuris equi*: lack of efficacy in treatment with macrocyclic lactones. *Veterinary Parasitology*, 201: 163-168.
- Yoseph, S., Smith, D.G., Mengistu, A., Teklu, F., Firew, T., Betere, Y. (2005). Seasonal variation in the parasite burden and body condition of working donkeys in East Shewa and West Shewa regions of Ethiopia. *Tropical Animal Health Production*, 37: 35-45.
- Zerihun, A., Bersissa, K., Bojia, E., Ayele, G., Tesfaye, M., Etana, D. (2011). Endoparasites of donkeys in Sululta and Gefersa Districts of Central Oromia, Ethiopia. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 10(14): 1850-1854.
- Zeryhun, T. & Tsegaw, F. (2016). Endoparasites of donkeys in Dessie and its surroundings, Northeastern Ethiopia. *Ethiopian Veterinary Journal*, 20(1): 79-90.
- Zidda, A., Varcasia, A., Sanna, G., Pipia, A.P., Tamponi, C., Sedda, G., Scala, A. (2016). Copromicroscopic monitoring of gastro-intestinal helminths in horses in Italy. In: Abstract Book, XXIX Congress Soipa, 21-24 giugno, p. 193.

Capitolo 3

I farmaci ed i trattamenti antielmintici

3.1 Introduzione

L'obiettivo del controllo delle infezioni parassitarie negli equidi è di ridurre al minimo il numero di elementi infettanti sui pascoli in modo da prevenire la comparsa di malattie cliniche e subcliniche. L'eradicazione della popolazione parassitaria da un equide non solo è impossibile ma accelererebbe lo sviluppo dell'antielmintico resistenza.

Circa due secoli fa, il trattamento degli endoparassiti era rudimentale e, consisteva nell'utilizzo di prodotti naturali che esercitavano un'azione meccanica nei confronti dei parassiti, rimuovendoli dai siti di elezione (Blane, 1826). Questi prodotti includevano il calomelano, semi d'anice, aloe, antimonio, liquirizia, semi di lino e argento vivo (Lyons et al., 1999). Il primo composto antiparassitario, con una reale efficacia verso i parassiti degli equini, è stato il disolfuro di carbonio il quale, si è dimostrato essere efficace nei confronti delle mosche (Hall, 1917). L'olio di chenopodio si dimostrò efficace nei confronti degli strongili intestinali (Hall et al., 1918), tuttavia, era caratterizzato da effetti collaterali, quali, anoressia e perdita di peso (Lyons et al., 1999).

I primi antiparassitari a essere utilizzati negli equidi sono stati, negli anni 1940, le fenotiazine, seguite successivamente, negli anni 1950, dalle piperazine (Lyons et al., 1999). I principali progressi si sono avuti tra il 1960 e il 1980 con l'introduzione dei benzimidazolici (BZ). Nel 1981, un altro importante step è stato raggiunto con l'introduzione dell'ivermectina (IVM).

I primi trattamenti antiparassitari, basati sul concetto dei trattamenti cadenzati, erano mirati al controllo di *S. vulgaris*, che rappresentava il parassita che si riscontrava con maggiore prevalenza ed era caratterizzato da un elevato potere patogeno. L'utilizzo dei trattamenti cadenzati è stato efficace nel ridurre la prevalenza di *S. vulgaris*, tuttavia ha posto le basi per la riduzione dell'*Egg Reappearance Period* (ERP) e lo sviluppo dell'antielmintico resistenza delle popolazioni di Cyathostomi (Kaplan, 2002).

3.2 Farmaci antiparassitari

Le molecole antiparassitarie attive nei confronti degli elminti degli equini sono piuttosto limitate: tre classi farmacologiche sono attive nei confronti dei nematodi e due nei confronti dei cestodi.

Le classi farmacologiche attive nei confronti dei nematodi sono:

- 1) Tetraidropirimidinici (PYR) (pyrantel);
- 2) Benzimidazolici (BZ) (mebendazolo, fenbendazolo);
- 3) Lattoni macrociclici (LM) (ivermectina, moxidectina).

Le classi farmacologiche attive verso i cestodi sono:

- 1) Isochinolonici (CHINO) (PZQ) (praziquantel)
- 2) Tetraidropirimidinici (PYR) (pyrantel);

3.2.1 Tetraidropirimidinici

Il pyrantel (PYR), *E*-1,4,5,6-tetrahydro-1-methyl-2-[2-(2-thienyl)vinyl] pirimidine, è un derivato dell'imidazotiazolo ed appartiene alla classe farmacologica delle tetraidropirimidine (Roberson, 1988) ed è disponibile sotto forma di sali pamoato (sin. embonato) e tartrato (figure 3.1 e 3.2).

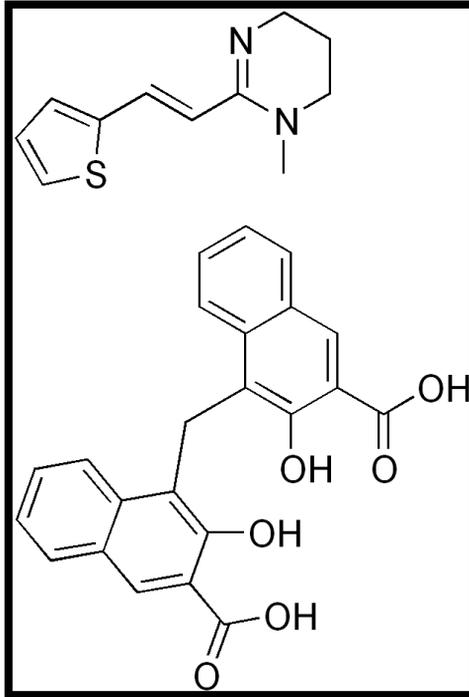


Fig. 3.1 Formula di struttura del Pyrantel pamoato

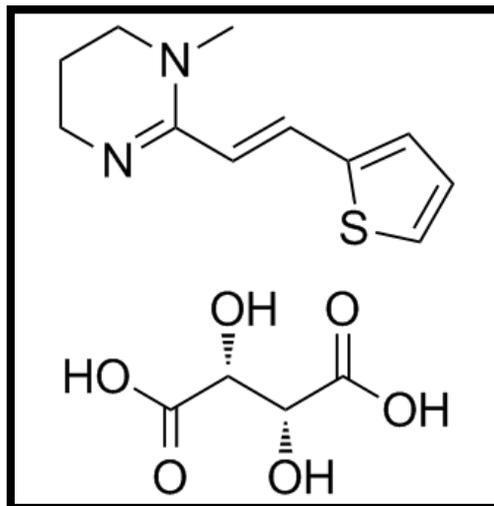


Fig. 3.2 Formula di struttura del Pyrantel tartrato

Il PYR pamoato è insolubile in acqua e scarsamente assorbito dal tratto gastrointestinale, infatti circa il 50-70% della dose ingerita viene espulsa attraverso le feci (Arundel, 1983); questo ridotto assorbimento ne aumenta la biodisponibilità a livello intestinale (Bjorn et al., 1996). Nell'organismo viene metabolizzato attraverso l'ossidazione dell'anello di tiofene e, probabilmente, i metaboliti polari che si rinvenivano nelle urine e nella bile non presentano attività antielmintica (Lanusse e Prichard, 1993).

Il PYR tartarato, invece, è solubile in acqua (180 mg/ml) ed è assorbito rapidamente dall'intestino dei monogastrici (Faulkner, 1982) mentre nei ruminanti il suo assorbimento è inferiore. Nell'organismo viene rapidamente metabolizzato e solo una piccola parte di esso viene escreta immodificata. L'eliminazione del farmaco avviene per via urinaria e attraverso le feci.

Il PYR è efficace nei confronti di *S. vulgaris*, dei piccoli strongili e *P. equorum*, mentre è caratterizzato da una moderata attività nei confronti di *S. edentatus* (70%) e *O. equi* (65%) (Mirck, 1985). Non è efficace nei confronti di *Gasterophilus* spp. tuttavia, ha azione terapeutica nei confronti dei cestodi *Anoplocephala* spp. se utilizzato al dosaggio di 13,2 mg/kg (Theodorides, 1985; Marchiondo et al., 2006; Reinemeyer et al., 2006).

Uno studio condotto successivamente da Reinemeyer et al. (2010) ha dimostrato che il PYR pamoato pasta è risultato efficace sia verso gli adulti (91,2%) sia verso le L4 (>99%) di *O. equi*.

Nei cavalli la somministrazione per 30 giorni consecutivi di bassi dosaggi di Pyrantel tartrato (2,65 mg/kg p.v.) si è dimostrata efficace nei confronti dei principali parassiti intestinali inclusi gli stadi adulti dei grossi e piccoli strongili (*S. vulgaris*, *S. edentatus*, *Triodontophorus* spp., *Cyathostomum* spp., *Cylicocycylus* spp. e *Cylicostephanus* spp.) e nei confronti degli stadi adulti e delle larve di quarto stadio di *P. equorum* (Valdez et al., 1995).

Il PYR agisce come agonista dei recettori dell'acetilcolina, sia a livello sinaptico che extrasinaptico, sulle cellule muscolari del nematode. Il legame che il farmaco instaura con i recettori acetilcolino-nicotinici, localizzati a livello della muscolatura somatica dei nematodi, produce contrazione e paralisi spastica della muscolatura dell'elminta, proprio come avviene per azione dell'acetilcolina (Ach) e ciò comporta la loro espulsione da parte dell'ospite (Martin, 1997; Martin et al., 2005). La somministrazione simultanea di Ach e PYR ha dimostrato che entrambi competono per lo stesso sito d'azione (Harrow e Gration, 1985) e che il PYR ha un potere 100 volte superiore nell'indurre le contrazioni muscolari

dell'elminta (Aubry et al., 1970); inoltre, l'effetto dell'Ach è facilmente reversibile mentre l'azione del PYR risulta essere più duratura.

I recettori acetilcolinici-nicotinici dei nematodi sono suddivisi in tre sottogruppi farmacologici in relazione alla affinità con il farmaco (Robertson et al., 2002; Martin et al., 2003). I sottogruppi sono: "N", più sensibile alla nicotina, alla metiridina e all'oxantel; "L", più sensibile al levamisolo ed al pyrantel e "B", più sensibile al befenio (Martin et al., 2004); ciò significa che l'attività del PYR verso i nematodi è probabilmente predominante sui recettori nicotinici di tipo "L". È ancora da stabilire se tutti i nematodi posseggano i tre sottogruppi di recettori (Sangster et al., 2005). Questi sottogruppi di recettori farmacologici possono aiutare a spiegare i meccanismi della farmacoresistenza nei confronti degli agonisti nicotinici così come il PYR. È possibile che l'uso intensivo di una molecola possa selezionare ceppi di parassiti che esprimono sottogruppi di recettori nicotinici meno sensibili al farmaco in questione. In Italia questa molecola è commercializzata come pasta orale da somministrare *per os* o come formulazione granulato da somministrare miscelato al mangime; il dosaggio consigliato nel cavallo è di 12,5 mg/kg nel caso di singola somministrazione, mentre per somministrazioni giornaliere il dosaggio è di 2,64 mg/kg/giorno.

I farmaci contenenti Pyrantel attualmente disponibili in Italia sono:

- ✓ **Antielmintico cavalli** (Candioli)
- ✓ **Strike pasta orale** (Acme)
- ✓ **Strike granulato** (Acme)
- ✓ **Strongid** (Zoetis Italia)

Da "L'Informatore Farmaceutico" – Veterinaria e zootecnia 2017 - EDRA

3.2.2 Benzimidazolici

I benzimidazolici (BZ) rappresentano una grande famiglia di composti connessi al tiabendazolo (TBZ) (Brown et al., 1961), inizialmente registrato per l'utilizzo nei cavalli nel 1961 (Drudge et al., 1981).

In accordo con la loro struttura chimica possono essere distinti in 4 gruppi (Lanusse and Prichard, 1993):

1. Benzimidazolici tiazolici: includono il TBZ ed il cabendazolo (CBZ)

2. Benzimidazolici metilcarbamati: includono il parbendazolo (PBZ), il mebendazolo (MBZ), il flubendazolo (FLBZ), ciclobendazolo (CIBZ), l'ossibendazolo (OBZ), il luxabendazolo (LBZ), l'albendazolo (ABZ), l'albendazolo sulfossido (ABZSO), il febendazolo (FBZ) e l'ossifendazolo (FBZ.SO);
3. Tioli benzimidazolici alogenati: triclabendazolo (TCBZ);
4. Probenzimidazolici: tiofanato (TPT), il febantel (FBT) ed il netobimin (NTB).

Le varie molecole differiscono fra loro per la presenza di gruppi funzionali diversi in posizione 2 e 5 della struttura base (figura 3.3).

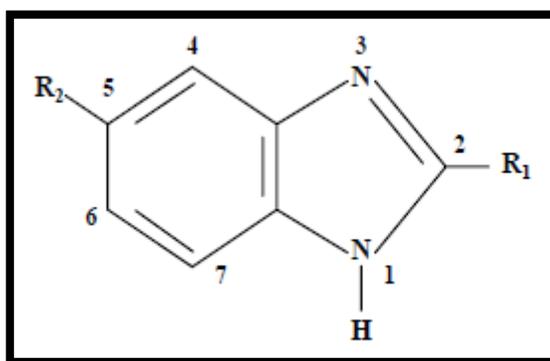


Fig. 3.3 Formula di struttura di base dei benzimidazolici

I benzimidazolici che sono stati registrati nel tempo per l'utilizzo nel cavallo sono: TBZ, MBZ (Brugman et al., 1971), OBZ (Theodorides et al., 1973), FBZ (Baeder et al., 1974), FBZ.SO (Averkin et al., 1975), CBZ (Hoff et al., 1970) e FBT (Delatour e Euzeby, 1983). Questi farmaci sono stati finalizzati al trattamento delle elmintiasi gastrointestinali e polmonari (Marriner e Bogan, 1985). La maggior parte di questi principi attivi (CBZ, FBZ.SO, FBZ, MBZ, OBZ, ABZ, PBZ e FBT) risulta essere altamente efficace (circa il 90%) nei confronti delle forme adulte sia dei grossi sia dei piccoli strongili intestinali, nei confronti degli adulti di *O. equi*, *P. vivipara* e *T. axei* (Courtney e Robertson, 1997). L'efficacia delle differenti molecole varia in funzione della specie del parassita coinvolto. Per esempio il FBZ somministrato alla dose di 7,5 mg/kg per 5 giorni consecutivi presenta una del 94,6% verso le larve dei piccoli strongili incistate nella mucosa; una efficacia dell'80% nei confronti delle larve in migrazione di *S. vulgaris* e risulta essere completamente efficace nei confronti delle larve in migrazione di *S. edentatus* (Duncan et al., 1980).

L'OBZ non ha efficacia verso le larve in migrazione di *S. vulgaris*, così come non è efficace nei confronti di *T. axei*, *H. muscae* e *D. megastoma* (Kates et al., 1975; Nawaliski e Theodorides, 1976, 1977).

I BZ non presentano azione terapeutica nei confronti delle larve di *Gasterophilus* spp.

I benzimidazolici ed i probenzimidazolici sono caratterizzati da un meccanismo d'azione simile: prevengono la polimerizzazione dei microtubuli nelle cellule eucariote creando un legame selettivo, irreversibile, nei confronti della β -tubulina del nematode (Lacey e Gill, 1994; Martin, 1997). Questa classe farmacologica, inoltre, impedisce l'utilizzazione del glucosio (Van den Bossche, 1982; Van den Bossche e De Nollin, 1973) e inibisce l'attività di vari enzimi metabolici quali ad esempio la maltato deidrogenasi (Tejeda et al., 1987; Sharma et al., 1989) e la fumarato riduttasi (Prichard, 1970, 1973; Barrowman et al., 1984).

Questa classe farmacologica è caratterizzata da un indice terapeutico elevato ed è ben tollerata nei mammiferi. Sebbene il principale effetto tossico sia rappresentato dalla teratogenicità, nel cavallo, incluse le fattrici gravide, il FBZ somministrato ad una dose di 100 mg/kg non produce effetti indesiderati (Becker, 1975) e le funzioni riproduttive degli stalloni non sono compromesse (Squires et al., 1978).

In Italia la molecola appartenente ai BZ, utilizzata per il controllo delle elmintiasi nel cavallo è rappresentata unicamente dal FBZ, il quale è disponibile in due formulazioni:

- ✓ **Panacur pasta cavalli** (Intervet Inter)
- ✓ **Panacur 10%** in formulazione drench (Intervet Inter.)

Da “L'Informatore Farmaceutico” – Veterinaria e zootecnia 2017 - EDRA

3.2.3 Lattoni macrociclici (avermectine e milbemicine)

I lattoni macrociclici (LM) rappresentano, ad oggi, i principali endectocidi utilizzati nel controllo delle parassitosi negli animali. Questi composti si suddividono in due classi: le avermectine e le milbemicine (figura 3.4).

Le avermectine derivano da *Streptomyces avermitilis* la cui fermentazione produce otto differenti composti definiti A_{1a}, A_{1b}, A_{2a}, A_{2b}, B_{1a}, B_{1b}, B_{2a} e B_{2b}. I primi composti ad essere utilizzati come antiparassitari furono l'ivermectina (IVM) e l'abamectina (ABM) negli anni '80. Nello specifico, l'IVM rivoluzionò il controllo antiparassitario negli animali da produzione, nella prevenzione delle *heart worm diseases* negli animali da compagnia e

nel controllo delle filariosi nell'uomo (Prichard et al., 2012). Successivamente alla IVM sono stati introdotti altri composti naturali e semisintetici quali la doramectina (DRM), l'epinomectina (EPM), la selamectina (SLM).

Le milbemicine, gli altri membri della classe dei LM, furono inizialmente isolati, prima delle avermectine, nel 1967 dalle fermentazioni di *Streptomyces hygroscopicus* e successivamente nel 1983 da *Streptomyces cyaneogriseus*. Inizialmente furono utilizzate, nel 1973, come insetticidi per la protezione del raccolto (Takiguchi et al., 1980); tuttavia non è stato realizzato il vero potenziale d'azione di questa classe di composti fino a quando non ne è stata descritta l'attività acaricida, insetticida e nematocida (Egerton et al., 1979).

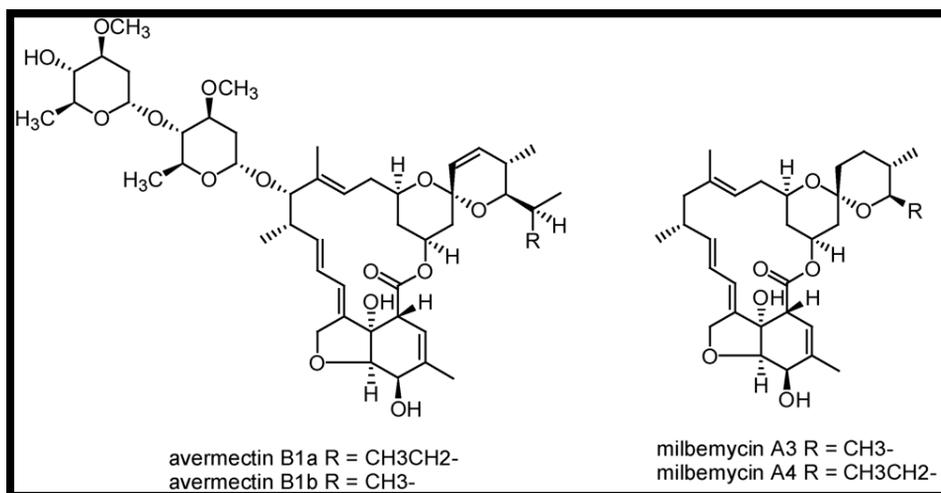


Fig. 3.4 Formula di struttura di base delle Avermectine e Milbemicine

I LM sono farmaci antiparassitari caratterizzati da un ampio spettro d'azione essendo efficaci sia nei confronti dei nematodi sia degli ectoparassiti (endectoparassiticidi) nelle specie ospiti (Jones et al., 1993; Kennedy e Philips, 1993; Logan et al., 1993; Miller et al., 1994; Xiao et al., 1994; Lyons et al., 1996; Di Pietro et al., 1997; Dorchies et al., 1998; Benz et al., 1989; Cambell et al., 1989; Conder e Cambell, 1995; McKellar e Benchaoui, 1996); tuttavia non sono efficaci nei confronti dei trematodi e dei cestodi in quanto questi parassiti non hanno siti di legame per i membri di questa classe farmacologica (Shoop et al., 1995; Neal 2002).

I LM agiscono legandosi ed aprendo i canali del cloro presenti esclusivamente nei neuroni e nei miociti degli invertebrati, consentendo così al cloro di penetrare all'interno delle cellule e provocare paralisi flaccida e conseguentemente morte del parassita (Cully et al, 1994; Cobb e Boeckh, 2009).

L'ivermectina, l'avermectina maggiormente utilizzata, è un derivato dell'ABM da cui differisce per la presenza di un gruppo metilene in posizione 26 (Campbell, 1989). Nel cavallo, fu inizialmente prodotta come soluzione acquosa contenente 20 mg/ml di IVM da utilizzare per iniezioni intramuscolari. Tuttavia, in seguito a effetti indesiderati quali anafilassi e clostridiosi nel sito d'inoculo, il prodotto fu ritirato dal mercato nel 1984 (Randi, 1984; Campbell et al., 1989). Oggi è disponibile in commercio una formulazione in pasta orale somministrabile attraverso una siringa graduata alla concentrazione di 200 µg/kg P.V. In alcuni Paesi è anche disponibile una formulazione liquida che può essere somministrata attraverso una sonda naso-gastrica. È altamente efficace nei confronti degli strongili intestinali del cavallo, tuttavia ha scarsa se non nulla efficacia verso le larve ipobiotiche dei piccoli strongili (Xiao et al., 1994).

La moxidectina è un derivato metossimetico semisintetico dell' "LL F-2924α", comunemente indicato come F-alpha o nemadectina.

La nemadectina è prodotta dalla fermentazione del batterio *Streptomyces cyaneogriseus* subsp. *noncyanogenus* e differisce dall'IVM per l'assenza di un gruppo di disaccaridi su C-13, una catena laterale olefinica a C-25 ed un gruppo metossido unico a C-23. A causa delle differenze nella composizione chimica e nell'attività biologica rispetto agli altri LM, la MOX è classificato come un LM di seconda generazione (Cobb e Boeckh, 2009).

Il primo prodotto ottenuto a base di MOX è stato una formulazione iniettabile per bovini approvata per l'uso commerciale in Argentina nel 1989 (Cobb e Boeckh, 2009). Nel cavallo questa molecola è stata introdotta come antiparassitario nel 1997. La MOX è commercializzata in gel orale al 2% alla concentrazione di 400 µg/kg P.V. È stato dimostrato avere un'ottima efficacia nei confronti dei nematodi: adulti e larve sia dei grandi che dei piccoli strongili, ascaridi, gasterofili, *Trichostrongylus axei* e *Habronema muscae* (Schumacher e Taintor, 2008); inoltre è caratterizzata da un'elevata efficacia nei confronti delle larve in ipobiosi dei ciatostominae e delle larve in migrazione dei piccoli e grandi strongili (DiPietro et al., 1997; Bairden et al., 2006).

IVM e MOX sono commercializzate anche in associazione al PZQ e questo amplia lo spettro di efficacia verso i cestodi.

I lattoni macrociclici esplicano la loro azione aumentando la permeabilità agli ioni Cl^- delle cellule muscolari dei nematodi (Martin e Pennington, 1989; Martin, 1997; McKellar e Benchaoui, 1996). Alcuni studi hanno inoltre suggerito l'esistenza di un'associazione tra i canali del cloro ed i recettori dell'acido γ -amminobutirrico (GABA) (Turner e Schaeffer, 1989), tuttavia altri studi non hanno confermato questo rapporto (Geary et al., 1992; Martin, 1997). L'efficacia terapeutica dei LM è attribuibile all'azione selettiva nei confronti di canali ionici del Cl^- , presenti sia nei nematodi sia negli ectoparassiti, ma assenti nei mammiferi (Martin, 1997); inoltre le proprietà farmacinetiche e farmacodinamiche di questi composti determinerebbero un'azione selettiva verso i nematodi.

Le avermectine sono composti altamente lipofili e si dissolvono in numerosi solventi organici quali il cloroformio e l'acetone, mentre la solubilità in acqua è piuttosto bassa; la MOX è invece caratterizzata da una solubilità in acqua maggiore se paragonata all'IVM e all'ABM (Lanusse e Prichard, 1993). Sia l'IVM che la MOX, successivamente alla loro somministrazione, si accumulano a livello epatico e renale, e proprio per questo motivo, se confrontati con altre classi di antiparassitari, permettono di ottenere maggiori volumi di distribuzione nell'organismo (Lanusse et al., 1997).

I principali siti di eliminazione delle avermectine sono rappresentati, in tutte le specie animali, dalla bile e dalle feci (Chiu e Lu, 1989); inoltre, considerevoli quantità di IVM vengono anche espulse nel latte attraverso la ghiandola mammaria.

Studi di farmacocinetica condotti nel cavallo hanno dimostrato che la principale via di eliminazione della MOX è rappresentata dalle feci. È stato dimostrato che circa il 77% della dose somministrata viene eliminata, attraverso le feci, come composto primario e che quindi la MOX nell'organismo viene solo in minima parte scissa in metaboliti attivi (Afzal et al., 1997).

I LM, confrontati con altri antielmintici, godono di un ampio margine di sicurezza e di elevati indici terapeutici; tuttavia, considerato che il GABA, nei mammiferi, è un neurotrasmettitore limitato al SNC, segni di neurotossicità potrebbero instaurarsi quando questi composti vengono somministrati a dosi elevate (Lankas e Gordon, 1989). Sebbene le differenti specie animali possano dimostrare svariati segni di tossicità, in genere è possibile riscontrare atassia, tremori e coma (Lankas e Gordon,

1989). Nei bovini, nelle pecore, nei maiali e nei cavalli, l'IVM, somministrata ad una posologia doppia rispetto al dosaggio terapeutico, non induce effetti embriotossici (Hotson, 1983; Leaning et al., 1983; Campbell e Benz, 1984; Schroder et al., 1986; McKissick et al., 1987). Inoltre, nel cavallo l'IVM, se somministrata per via orale ad un dosaggio triplo rispetto a quello consigliato (600 µg/kg), non influenza negativamente la fertilità delle fattrici e lo sviluppo dei puledri (McKissick et al., 1987).

I principali prodotti a base di IVM disponibili in Italia sono:

- ✓ **Avalon** (Acme)
- ✓ **Avatar** (Eco Animal Health)
- ✓ **Eqvalan** (Merial Italia)
- ✓ **Eraquell** (Virbac)
- ✓ **Maximec pasta OS** (Cross Vetpharm)
- ✓ **Neomectin[®] gel orale** (Le Vet)

Sono disponibili inoltre due preparazioni che associano IVM e PZQ:

- ✓ **Eqvalan duo** (Merial Italia)
- ✓ **Equimax gel** (Virbac)

La MOX e la MOX+PZQ sono commercializzate rispettivamente come
I principali prodotti a base di MOX disponibili in Italia sono:

- ✓ **Equest gel orale** (Zoetis Italia)

E' disponibile inoltre una sola preparazioni che associano MOX e PZQ:

- ✓ **Equest pramox** (Zoetis Italia)

Da "L'Informatore Farmaceutico" – Veterinaria e zootecnia 2017 – EDRA

I farmaci ed i trattamenti antelmintici

Tab. 3.1 Antelmintici per equini disponibili in Italia

CLASSE FARMACOLOGICA E PRINCIPIO ATTIVO	NOME COMMERCIALE (Casa farmaceutica)	VIA di somministrazione	POSOLOGIA (mg/kg p.v.)	TEMPO DI SOSPENSIONE (giorni)	PARASSITI SENSIBILI					
					Tenie	Nematodi Intestinali	Dy	S/des	Asc	Gas.
TETRAIDROPIRIMIDINE										
PYR pamoato	Antelmintico cavalli (Candioli)	orale	5,8 mg/kg	Carne 0	+	GS, PS, Ox	+/-	n.s.	+	-
	Strongid (Zoetis Italia)	orale	6,6 mg/kg	Carne 10	Anopl (x2) (13,2 mg/kg)	GS, PS, Ox	+/-	n.s.	+	-
	Strike granulato (Acme)	orale	6,94 mg/kg (25 g/250 kg)	Carne 0	-	GS, PS	+/-	n.s.	n.s.	-
	Strike pasta (Acme)	orale	13,2 mg/kg	Carne 0	Anopl (10 g/100 kg)	GS, PS (5 g/100 kg)	+/-	n.s.	+	-
BENZIMIDAZOLICI										
FBZ	Panacur 10% (Intervet Italia)	orale	7,5 mg/kg	Carne: 6-7 Latte: non consentito in animali DPA	n.s.	GS, PS, Ox (3 ml/40 kg)	+/-	+ (25 ml/50 kg)	+	-
	Panacur pasta (Intervet Italia)	orale	7,5 mg/kg	Carne 20	n.s.	GS, PS, Ox	+/-	+ (1 siringa/50kg)	+	-
LATTONI MACROCICLICI										
IVM	Avalon (Acme)	orale	0,2 mg/kg	non consentito in animali DPA	-	GS, PS (adulti e L4 luminali), Ox (adulti e L4), Ha	+	+	Adulti ed L5	+
	Avatar (Acme)	orale	0,2 mg/kg	Carnei: 34 Latte: no in animali DPA	-	GS, PS (adulti e L4 luminali), Ox (adulti e L4), Ha	+	+	Adulti ed L5	+

I farmaci ed i trattamenti antelmintici

	Eqvalan (Merial)	orale	0,2 mg/kg	Carne 21 gg	-	GS, PS (adulti e L4 luminali), Ox (adulti e L4), Ha	+	+	Adulti ed L5	+
	Eraquell (Virbac)	orale	0,2 mg/kg	Carne 30 gg Latte: no in animali DPA	-	GS, PS (adulti e L4 luminali), Ox (adulti e L4), Ha	+	+	Adulti ed L5	+
	Maximec pasta (Virbac)	Orale	0,2 mg/kg	Carne 34 gg	-	GS, PS (adulti e L4 luminali), Ox (adulti e L4), Ha	+	+	Adulti ed L5	+
	Neomectin (Le Vet)	Orale	0,2 mg/kg	Carne: 18 gg Latte: no in animali DPA	-	GS, PS (adulti e L4 luminali), Ox (adulti e L4), Ha	+	+	Adulti ed L5	+
MOX	Equest gel (Zoetis Italia)	orale	0,4 mg/kg	Carne 32	-	GS, PS, Ox, Ha	+	+	+	+
ASSOCIAZIONI										
IVM + PZQ	Eqvalan duo (Merial)	orale	0,2 + 1 mg/kg	Carne: 30 gg Latte: no in animali DPA	Anopl	GS, PS (adulti e L4 luminali), Ox (adulti e L4), Ha	+	+	+	+
	Equimax (Virbac)	orale	0,2 + 1,5 mg/kg	Carne: 35 gg Latte: no in animali DPA	Anopl	GS, PS (adulti e L4 luminali), Ox (adulti e L4), Ha	+	+	+	+
MOX + PZQ	Equest pramox (Zoetis Italia)	orale	0,4 + 2,5 mg/kg	Carne: 64 gg Latte: no in animali DPA	Anopl	GS, PS, Ox, Ha	+	+	+	+

LEGENDA. TS: Tempo di sospensione; DPA: destinato a produzione di alimenti; Parassiti sensibili: Tenie: Anopl = *Anoplocephala* spp. Nematodi Intestinali (GS = Grandi Strongili; PS = Piccoli Strongili, Ox = *Oxyuris equi*, Ha = *Habronema* spp.). L4: larve di quarto stadio Dy = *Dictyocaulus arnfieldi*; S/des = *Strongyloides westeri*. Asc = *Parascaris equorum*. + = efficace; - = non efficace; +/- = efficacia incompleta; n.s. = non specificato; x2 = doppia dose. Modificato da Informatore Farmaceutico di Veterinaria e Zootecnica 2017, EDRA, Milano.

3.3 Proprietà dei farmaci antiparassitari

Nella scelta di un principio attivo da utilizzare per un trattamento farmacologico bisognerebbe considerare diversi parametri quali:

- ✓ Attività antielmintica: dev'essere valutata in base ai parassiti presenti. Importante è quindi conoscere lo spettro d'azione del farmaco. Esistono antiparassitari specifici, che agiscono su un gruppo ristretto di parassiti ed antiparassitari ad ampio spettro che possono essere utili quando ci si trova di fronte a dei fenomeni di poliparassitismo.
- ✓ Efficacia antielmintica: espressa in percentuale di riduzione delle uova in un grammo di feci (UPG) in seguito ad un trattamento antiparassitario e si calcola attraverso il *faecal egg count reduction test* (FECRT).
- ✓ Indice di sicurezza: rapporto tra dose massima tollerata dagli animali e dose terapeutica. Più è alta la differenza più è sicuro il farmaco.
- ✓ Tempo di sospensione: il tempo che deve essere rispettato, dopo un trattamento antiparassitario, per poter destinare l'animale ed i suoi derivati al consumo umano. I tempi di sospensione variano a seconda della specie e in base alla modalità di somministrazione del farmaco.
- ✓ Embriotossicità e capacità teratogena: teoricamente dovrebbero essere assenti, tuttavia molto dipende dalla dose impiegata, dalla sensibilità delle specie animale a cui si somministra il farmaco, dallo stadio della gravidanza (generalmente si ha un rischio maggiore nel periodo iniziale della gestazione)
- ✓ Praticità di utilizzo: riguarda la via di somministrazione (parenterale o orale) e la formulazione del farmaco.

3.4 Tipologia dei trattamenti antiparassitari

Nel corso degli anni sono stati descritti differenti regimi di trattamento antiparassitario, tuttavia la maggior parte di questi era basato sull'*interval-dose program* introdotto negli anni 1960 (Drudge e Lyons, 1966). In questi anni, grazie all'introduzione di molecole ad ampio spettro, l'idea di avere un'azienda senza parassiti rappresentava un obiettivo da raggiungere, tuttavia, negli ultimi dieci anni ci si è resi conto che l'utilizzo della strategia dell'*interval dose program* non solo non raggiunge questo scopo

ma è uno dei fattori che potrebbe contribuire allo sviluppo dell'antilemintico resistenza.

3.4.1 *Interval-dose program (trattamento soppressivo)*

Questa tipologia di trattamento consiste nel sottoporre a trattamento antiparassitario tutti i soggetti presenti all'interno di un'azienda ad intervalli di tempo prestabiliti, in genere ogni 2 mesi. Negli USA alcuni autori riportano la pratica di somministrare gli antelmintici a cadenza mensile (Herd e Majewski, 1994). L'*interval-dose* rappresenta un esempio di trattamento soppressivo che si è diffuso ampiamente a livello mondiale in quanto non prevede un controllo clinico dei soggetti ed una diagnosi parassitologica e quindi di facile applicazione (Lloyd et al., 2000; O'Meara e Mulcahy, 2002). Questo tipo di schema terapeutico, tuttavia, non permette la valutazione dell'efficacia delle molecole utilizzate e dello schema terapeutico; secondo molti parassitologi rappresenterebbe uno dei principali fattori che ha favorito lo sviluppo dell'antelmintico resistenza nelle aziende equine (Kaplan e Nielsen, 2010).

3.4.2 *Strategic dosing (trattamento strategico)*

A differenza di quanto avviene per l'*interval-dose program* lo *strategic dose* tiene in considerazione le differenze stagionali, identificando così dei periodi a maggiore rischio durante i quali si può contrarre la parassitosi. In questo regime i trattamenti antiparassitari vengono *in primis* effettuati a tutti i soggetti, durante la stagione del pascolo, per poi essere ripetuti ad intervalli di tempo cadenzati, senza comunque effettuare una diagnosi coprologica. Come risultato, il numero di trattamenti annui dovrebbe essere inferiore se paragonato all'*interval dose program*.

3.4.3 *Continuous, daily treatment (somministrazione quotidiana)*

Questo schema di trattamento consiste nella somministrazione quotidiana di PYR tartrato, miscelato con i concentrati, ai cavalli durante tutto il corso dell'anno o durante il periodo del pascolo. Questo regime di trattamento dovrebbe sopprimere le L3 prima che invadano la mucosa o gli altri tessuti e dovrebbe inoltre avere un'azione terapeutica nei confronti dei parassiti adulti. Di conseguenza le UPG dei cavalli sottoposti a questo regime di

trattamento dovrebbero rimanere basse durante tutto il corso della somministrazione.

3.4.4 *Selective therapy (trattamento selettivo)*

I trattamenti selettivi differiscono notevolmente dai trattamenti di tipo strategico in quanto abbandonano il principio di sottoporre a trattamento antiparassitario tutti i soggetti presenti all'interno dell'azienda e trattare solo quelli che ne hanno realmente necessità.

I trattamenti selettivi furono inizialmente sviluppati per il controllo dei tricostrongili nei piccoli ruminanti (Kenyon et al., 2009). Un metodo per identificare gli animali da trattare era basato sul FAMACHA, sviluppato in Sud Africa ed introdotto in USA dall'*American Consortium for Small Ruminant Parasite Control*. Questo metodo valutava il colore delle mucose apparenti e identificava, in base al pallore e quindi indirettamente al grado di anemia strettamente associato alla parassitosi sostenuta da *Haemonchus contortus*, quali soggetti trattare (Malan et al., 2001; Burke et al., 2007). Nel corso degli anni altri parametri sono stati utilizzati nei ruminanti per identificare quali soggetti sottoporre al trattamento selettivo come il peso, la produzione latte e il DISCO (Diarrea Index Score) (Cringoli et al., 2008; Di Loria et al., 2009; Kenyon et al., 2009).

Nei cavalli e negli asini i trattamenti selettivi si basano sul principio di sottoporre a trattamento solo quei soggetti che dall'esame coprologico presentano un predeterminato valore cut-off di UPG differente tra cavalli ed asini (Nielsen et al., 2006a; Matthews e Burden, 2013).

Ad oggi la *faecal egg count* (FEC) rappresenta la metodica ufficiale adottata dalla *World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology* (WAAVP) al fine di valutare l'efficacia degli antielmintici nei cavalli, l'eventuale insorgenza di farmaco resistenza e per determinare il corretto intervallo tra i trattamenti (Nielsen et al., 2013).

Come regola generale i parassiti sono differientemente dispersi tra i loro ospiti (Crofton, 1971; Sreter et al., 1994; Galvani 2003) con una piccola percentuale di cavalli che eliminano la maggior quantità di uova (Kaplan e Nielsen, 2010; Lyons et al., 2012; Relf et al., 2013). Infatti, è stato dimostrato che circa il 20-30% dei cavalli presenti in azienda si rende responsabile dell'eliminazione di circa il 70-80% delle uova (Kaplan e Nielsen, 2010; Relf et al., 2013). Questa ipotesi è definita come "*regola 80:20*" (Matthews e Lester, 2015)

Proprio per questo motivo, identificando quei soggetti definiti medi ed alti eliminatori, si riuscirebbe a controllare la contaminazione dei pascoli (tabella 3.2). Il concetto del trattamento selettivo si basa sul principio che i cavalli, nel tempo, eliminano con le feci sempre la stessa quantità di uova (Gomez e Georgi, 1991; Dopfer et al., 2004; Nielsen et al., 2006b; Becher et al., 2010; Wood et al., 2013). Proprio per questo motivo i cavalli identificati e classificati come bassi eliminatori sono destinati a restare tali, anche in assenza di trattamenti antiparassitari (Nielsen et al., 2014b).

Non è stato però facile stabilire il valore cut-off al di sopra del quale sottoporre i cavalli a trattamento antiparassitario, in quanto, non esiste una comprovata correlazione tra le UPG prodotte ed il numero di strongili intestinali adulti a livello intestinale. Tuttavia è stato riscontrato che, cavalli con $UPG < 500$ erano caratterizzati da una carica di parassiti adulti nettamente inferiore rispetto a quelli con $UPG > 500$ (Nielsen et al., 2010). C'è un consenso generale nell'utilizzare 200 UPG come valore cut-off (Nielsen et al., 2006b), questa tesi sembrerebbe essere avvalorata da Uhlinger (1993), che, analizzando i valori di cutoff suggeriti da diversi laboratori di analisi parassitologiche, ha riscontrato un parere abbastanza univoco nel fissare questo valore a 200 UPG. Questo cut off è stato inoltre supportato dal fatto che la maggior parte degli studi che hanno valutato le strategie per i trattamenti selettivi hanno utilizzato dei valori soglia di UPG in un range di 100-300 (Gomez e Georgi, 1991; Duncan e Love, 1991; Krecek et al., 1994; Matthee e McGeoch, 2004; Nielsen et al., 2006a). Uno studio recente ha dimostrato che utilizzando un valore cut-off di 200 UPG lascerebbe circa il 50% dei cavalli presenti in azienda privi del trattamento antiparassitario, ma abbasserebbe la carica parassitaria del 95% (Kaplan e Nielsen, 2010). Tuttavia questi valori dovrebbero essere interpretati con grande cautela in quanto, in alcuni cavalli con una $FEC < 100$ UPG sono stati rinvenuti a livello intestinale più di 300.000 strongili intestinali ed è ancora poco chiaro se questa carica parassitaria possa rappresentare un pericolo per la salute degli animali (Nielsen et al., 2010). Inoltre bisogna sottolineare che non è stata riscontrata una relazione lineare tra le UPG e la conta di parassiti adulti a livello intestinale (Nielsen et al., 2014b).

Tab. 3.2 Linee guide per la classificazione dei cavalli nelle differenti categorie in base all'eliminazione delle UPG e la percentuale attesa della popolazione equina appartenente a ogni categoria (Kaplan e Nielsen, 2010).

Categoria	UPG	% della popolazione^a
Bassi eliminatori	0-200	50-70
Medi eliminatori	200-500	10-20
Alti eliminatori	>500	20-30

Questi valori sono solo stimati e la percentuale dei cavalli appartenenti alle singole categorie potrebbe variare nelle diverse aziende in relazione a differenti fattori.

Per poter assegnare ogni singolo cavallo ad una delle categorie di eliminatori bisognerebbe effettuare più di un esame coprologico, infatti, uno studio danese, in cui la FEC è stata valutata ogni sei mesi per un periodo di 3 anni, più del 90% dei cavalli con FEC < 200 UPG per due esami consecutivi ha mostrato una FEC < 200 anche al terzo controllo (Nielsen et al., 2006a). Alcuni cavalli potrebbero, tuttavia, passare da una categoria ad un'altra specialmente se la FEC è prossima ai valori cut-off (Nielsen et al., 2014b).

Questa proporzione sembrerebbe non essere uguale negli asini (tabella 3.3) in cui sembrerebbe essere più equamente distribuita, questo molto probabilmente è ascrivibile al limitato numero di trattamenti effettuati in questa specie animale (Veneziano, comunicazione personale).

Tab. 3.3 Classificazione degli asini nelle differenti categorie in base all'eliminazione delle UPG (Veneziano, comunicazione personale).

Categoria	UPG	% della popolazione
Bassi eliminatori	0-200	38
Medi eliminatori	200-500	19
Alti eliminatori	>500	43

Sempre nell'asino il valore di cut-off al quale sottoporre i soggetti a trattamento antiparassitario è maggiore rispetto al cavallo, ed equivale a 300 UPG (Matthews e Burden, 2013).

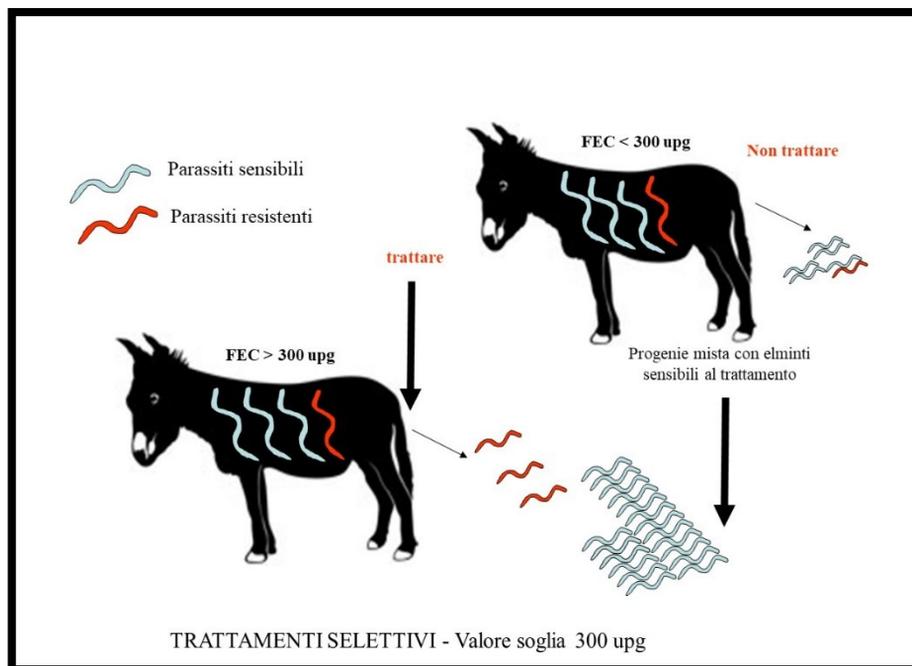


Fig. 3.5 Schema di trattamenti selettivi nell'asino basato sulla FEC

Sostituendo così i trattamenti selettivi a quelli strategici è possibile ridurre nei cavalli come negli asini, il numero dei trattamenti per anno nelle singole aziende (Little et al., 2003).

I trattamenti selettivi basati sulla FEC, sono ampiamente raccomandati dall'*American Association of Equine Practitioners* (AAEP) (Nielsen et al., 2013).

Un trattamento di base, indipendentemente dalla FEC e nei soggetti al di sopra dell'anno di età, dovrebbe essere effettuato con un farmaco antiparassitario ad ampio spettro (IVM+PZQ o MOX+PZQ), a tutti i cavalli ed asini almeno una volta l'anno. Questo trattamento permetterebbe di tenere sotto controllo, oltre agli strongili intestinali, anche altri tipi di parassiti come ad esempio tenie e *Gasterophilus* spp., spesso associati a falsi negativi o non diagnosticabili con gli esami coprologici.

I trattamenti di tipo selettivo non dovrebbero essere applicati ai puledri nel corso del primo anno di vita durante il quale, invece, dovrebbero ricevere almeno 4 trattamenti antiparassitari (Tzelos e Matthews, 2016). Il primo trattamento dovrebbe essere effettuato, nei confronti degli ascaridi, preferibilmente con il fenbendazolo (FBZ), verso i 2-3 mesi di vita. Un secondo trattamento è consigliato verso i 6 mesi di vita, utilizzando sempre un BZ; a questa età è consigliabile, inoltre, effettuare un primo esame coprologico al fine di valutare se la carica parassitaria è costituita principalmente da strongili o da ascaridi. Il 3° ed il 4° trattamento andrebbero effettuati rispettivamente a 9 e 12 mesi; questi ultimi due trattamenti hanno come obiettivo il controllo degli strongili intestinali. In questa fase, sarebbe opportuno effettuare un controllo parassitologico al fine di valutare le specie parassitarie presenti e valutare se il trattamento dovrebbe essere effettuato nei confronti di *P. equorum* (benzimidazolici), strongili intestinali (ivermectina o moxidectina) o entrambi (pyrantel) (Tzelos e Matthews, 2016).

Oltre a *Parascaris* spp., il principio dei trattamenti selettivi non può essere applicato ad altri numerosi parassiti quali *O. equi*, le larve di *Gasterophilus* spp., *S. westeri*, *Onchocerca* spp., *Drashia* spp. e *Habronema* spp. Sebbene questi parassiti non rappresentino una reale minaccia per la salute degli equidi, le lesioni locali che provocano possono richiedere interventi specifici; ciò si rende particolarmente evidente nel caso di *Onchocerca* spp., che può provocare dei noduli sottocutanei e peritendinei che richiedono un trattamento locale (Lia et al., 2017).

Il principale obiettivo dei trattamenti selettivi è quello di ridurre lo sviluppo dell'antielmintico-resistenza; infatti, riducendo il numero dei trattamenti antiparassitari e aumentando il numero dei parassiti in *refugia*, sarà automaticamente ridotta la pressione per lo sviluppo di resistenza nelle popolazioni di parassiti (van Wyk, 2001). Inoltre negli equidi l'utilizzo della FEC permette di sviluppare un'efficace strategia di trattamenti antiparassitari e ridurre i costi ad essi associati (Lester et al., 2013; Matthews e Lester, 2015).

Ad oggi, sebbene l'utilizzo dei trattamenti selettivi sia ampiamente diffuso a livello mondiale (Nielsen et al., 2014b), restano comunque alcuni interrogativi (Nielsen et al., 2014c); per esempio non sono noti gli effetti dell'applicazione dei trattamenti selettivi a lungo termine e è condiviso da alcuni autori il rischio della riemergenza dei grandi strongili (in particolare *S. vulgaris*) a causa della riduzione della frequenza dei trattamenti in una parte dei cavalli ed asini (Nielsen et al., 2014a), confermato da uno studio

condotto da Nielsen et al. (2012a,b) che hanno dimostrato una correlazione diretta tra la terapia selettiva e la presenza di *S. vulgaris*.

3.5 I trattamenti antiparassitari nell'asino

In Italia, ad oggi, non vi sono farmaci antiparassitari registrati per la specie asinina; per questo motivo vengono impiegati, con uso in deroga, i farmaci disponibili per gli equini e ruminanti senza calcolare i dosaggi e senza valutare la farmacocinetica delle differenti molecole (Veneziano et al., 2011; Gokbulut et al., 2014). Tuttavia, nella pratica equina i ricercatori ed i veterinari ippisti condividono il concetto che l'asino “*non è un piccolo cavallo con orecchie lunghe*” e che le differenze fisiologiche tra queste due specie si concretizzano con diversi andamenti della farmacocinetica e farmacodinamica che influenzano profondamente la scelta delle molecole ed i regimi di dosaggio (Grosenbaugh et al., 2011).

Lo sviluppo dell'asino in ambiente desertico e il conseguente adattamento alla privazione dell'acqua alterano la distribuzione plasmatica dei farmaci e di conseguenza l'assorbimento. Nell'asino, a differenza di quanto avviene nel cavallo, anche in corso di disidratazione sino al 20%, viene mantenuto lo stesso volume plasmatico (Matthews et al., 1997).

Inoltre la capacità da parte di questa specie animale di sopravvivere anche in condizioni estreme, ha delle implicazioni sulla biotrasformazione ed il metabolismo dei farmaci somministrati (Grosenbaugh et al., 2011). Sembra che gli asini abbiano una capacità maggiore di metabolizzare alcune molecole a causa di una diversa attività dell'isoenzima citocromo P450 (Peck et al., 1997). Il citocromo P450 appartiene ad una superfamiglia enzimatica di emoproteine presenti in tutti gli esseri viventi ed è inclusa nella sottoclasse enzimatica delle ossidasi a funzione mista (Danielson, 2002). Questa superfamiglia rappresenta il principale meccanismo di detossificazione dei farmaci ed è una delle cause responsabili del rapporto dose/risposta in soggetti differenti che assumono lo stesso principio attivo (Parkinson, 1996). Il differente range di risposta ad un farmaco, oltre a fattori quali età, sesso e stato di salute di un soggetto, varia anche a seconda della velocità di metabolizzazione di un principio attivo, la quale deriva da un polimorfismo genetico nel citocromo P450. Di tutte le isoforme enzimatiche del citocromo P450 solo una piccola parte comprendente gli enzimi CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9, CYP1A2 e CYP2E1 agisce nel metabolismo dei farmaci; tra questi l'isoforma più attiva è rappresentata dal CYP3A4.

Proprio per questo motivo è possibile ipotizzare che, nell'asino e nel cavallo, ci siano delle differenze sulla biodisponibilità dei farmaci somministrati che possano alterare a loro volta gli intervalli di dose (Kinabo e Bogan, 1989; Horspool e McKellar, 1990; Horspool et al., 1994; Mealey et al., 1997). Tuttavia, in assenza d'informazioni specifiche, si ipotizza che il metabolismo e la distribuzione dei farmaci nella specie asinina sia simile a quella equina, per questo motivo i dosaggi terapeutici vengono estrapolati da quelli usati nel cavallo. In base a quanto riportato, apparentemente l'asino presenterebbe una maggiore capacità rispetto al cavallo di metabolizzare e/o eliminare farmaci; per cui la dose e la posologia utilizzate in quest'ultimo potrebbero non essere appropriate per l'asino e, per alcune molecole, la specie asinina sembrerebbe richiedere dosaggi superiori e frequenze di somministrazioni più ravvicinate (Lizarraga et al., 2004).

Ad una attenta analisi della letteratura disponibile, sono limitati gli studi che hanno valutato la cinetica e l'efficacia delle singole molecole. Si impone una evidenza ed una verifica scientifica circa il dosaggio efficace e la tollerabilità delle diverse molecole farmacologiche ed in particolare quelle di frequente utilizzo pratico come gli antiparassitari.

Gokbulut et al. (2005) hanno valutato la farmacocinetica e l'escrezione nelle feci dell'IVM e della doramectina (DRM) nell'asino. A tale scopo 6 asini sono stati suddivisi in due gruppi di trattamento. Gli animali appartenenti ai due gruppi sperimentali sono stati trattati rispettivamente con IVM orale e DRM iniettabile somministrate entrambe per via orale in singola dose alla posologia di 200 µg/kg P.V. Successivamente alla somministrazione dei farmaci, sono stati eseguiti prelievi ematici a 1, 2, 4, 8, 12, 24, 32, 48 ore e 3, 4, 7, 9, 12, 15, 20, e 30 giorni. I campioni di feci sono stati raccolti direttamente dall'ampolla rettale prima della somministrazione del farmaco e successivamente a 8, 12, 24, 32, 48 ore e 3, 4, 7, 9 giorni. I risultati di questo studio hanno dimostrato che sebbene IVM e DRM abbiano presentato un assorbimento simile, il declino plasmatico e l'area al di sotto della curva di concentrazione (AUC) sono stati inizialmente più veloci e maggiori rispetto a quelli della DRM. Queste differenze potrebbero essere associate alle differenti proprietà fisico-chimiche esistenti tra IVM e DRM. La maggiore persistenza della DRM e quindi un maggior tempo di persistenza plasmatica, rispetto all'IVM, potrebbe conferire una efficacia maggiore nei confronti dei parassiti intestinali degli equidi. In questo studio è emerso che la maggiore AUC (119,3 ng giorno/ml) ed il maggiore tempo di persistenza medio (MRT =

6,5 giorni) di entrambe le molecole, sia nel plasma che nelle feci, riflettono una maggiore persistenza ed un maggior assorbimento dal tratto gastrointestinale negli asini rispetto ai cavalli, che presentano, invece, un $AUC = 46,1$ ng giorno/ml ed un $MRT = 2,3$ giorni (Gokbulut et al., 2001a). Sebbene i valori fecali di AUC sono risultati maggiori ($119,3 \pm 1,2$ μ g giorno/ml) nel gruppo sottoposto a trattamento con DRM, questo valore non è risultato significativamente differente da quello ottenuto negli asini sottoposti a trattamento con IVM ($228,9 \pm 1,2$ μ g giorno/ml). Maggiori valori di AUC sia nei campioni di sangue sia nei campioni di feci ottenuti per l'IVM rispetto alla DRM ne suggeriscono il maggior tasso di metabolizzazione. L'eliminazione nelle feci del principio attivo tal quale è stata pari al 54,4% e del 71,5% rispettivamente per l'IVM e per la DRM. La minore percentuale di IVM escreta con le feci può essere dovuta ad una sua maggiore biotrasformazione rispetto alla DRM. La percentuale di escrezione dell'IVM riportata nell'asino, inoltre è inferiore rispetto a quella riportata nel cavallo (74,3%). (Perez et al., 2001). L'escrezione di IVM nelle feci dei cavalli è stata riportata fino a 40 giorni con un valore di 0,6 ng/g (Perez et al., 2001) rispetto a quanto invece osservato nell'asino (9 giorni e 50 ng/g) (Gokbulut et al., 2005). Questa differenza potrebbe suggerire che la percentuale di farmaci escreti attraverso le feci sia superiore rispetto a quanto riportato da Gokbulut et al. (2005) che, tuttavia, l'hanno valutata solo fino a 9 giorni post somministrazione. Nei cavalli, inoltre, la presenza di IVM e DRM nelle feci, in seguito a somministrazione per via orale, è stata riportata per entrambe le molecole fino ai 4 giorni successivi (50 ng/g) (Gokbulut et al., 2001a); nell'asino, invece, è stata riportata a 9 giorni (50 ng/g) (Gokbulut et al., 2005). Questa differenza potrebbe essere associata sia alle differenze anatomiche esistenti tra asini e cavalli sia alla differente alimentazione che viene somministrata a queste due specie animali (Gokbulut et al., 2005).

Sempre nell'asino è stata valutata l'efficacia dell'eprinomectina (EPM) pour-on in infezioni sostenute da *D. arnfieldi* (Veneziano et al., 2011). A tale scopo sono stati selezionati quindici asini, che non erano stati sottoposti ad alcun trattamento antiparassitario nei 9 mesi antecedenti lo studio. Dieci animali sono stati assegnati, *at random*, al gruppo di trattamento antiparassitario con EPM pour-on, alla dose dei bovini 0,5 mg/kg P.V.; i restanti 5 asini costituivano gli animali del gruppo controllo non trattato. I campioni individuali di feci sono stati prelevati ai giorni -2, 0 (giorno del trattamento) e successivamente ai giorni 7, 14, 21 e 28. La conta delle larve nelle feci (LPG) è stata effettuata utilizzando la tecnica di

Baermann ed identificate in base alle chiavi morfologiche proposte da Cameron (1926). L'EPM è risultata totalmente efficace verso *D. arnfieldi* per tutto il periodo sperimentale. Inoltre, considerato che questa molecola è registrata per i bovini con assenza di tempi di sospensione nel latte, il suo utilizzo si potrebbe rivelare possibile anche negli asini che producono latte destinato al consumo umano. In seguito a questo studio, la disposizione plasmatica e l'escrezione dell'EPM nel latte, dopo somministrazione pour-on nell'asino, è stata valutata da Gokbulut et al. (2012). A tal fine 16 asine in lattazione sottoposte a trattamento pour-on con EPM alla dose di 0,5 mg/kg hanno evidenziato che, la massima concentrazione media di EPM nel latte ($C_{max} = 2,69$ ng/ml) è nettamente inferiore a quella del residuo massimo limite (20 ng/ml) stabilito dalla FAO e proprio per questo motivo l'EPM risulta una molecola che potrebbe essere utilizzata negli asini che producono latte destinato al consumo umano (Gokbulut et al., 2012).

Tex et al. (1993) e Coles et al. (1998) hanno valutato, nell'asino, l'efficacia dei LM verso *D. arnfieldi*; nello specifico l'IVM, in seguito a somministrazione orale alla dose di 0,2 mg/kg, ha presentato, 14 giorni dopo il trattamento, un'efficacia del 100% mentre, la somministrazione *per os* di MOX alla dose di 0,4 mg/kg ha presentato un'efficacia del 100% sino al ventunesimo giorno post trattamento. Un ulteriore studio ha valutato la disposizione plasmatica, la concentrazione nel pelo e l'efficacia antiparassitaria dell'EPM in seguito a somministrazione pour-on nell'asino (Gokbulut et al., 2011). Dodici asini sono stati sottoposti a trattamento antiparassitario con EPM alla dose registrata per i ruminanti (0,5 mg/kg P.V.). I campioni di pelo ($> 0,05$ gr) sono stati raccolti prima del trattamento antiparassitario e successivamente a 24, 48, 72, 96, 120 ore e nei giorni 6, 8, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 35 e 40; i campioni di sangue, sono stati prelevati prima della somministrazione del farmaco e successivamente a 1, 2, 4, 8, 12, 16, 24, 32, 48, 72, 96, 120 ore e nei giorni 6, 8, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 35 e 40; i campioni di feci sono stati prelevati prima della somministrazione del farmaco e successivamente ai giorni 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 e 56. Prima del trattamento antiparassitario gli asini presentavano una media di UPG di strongili intestinali pari a 1.361 (200 – 3.190 UPG). La FECR eseguita dopo il trattamento ha presentato, nei giorni 7 e 14 valori pari al 100%; e dal giorno 21 sino al giorno 56 valori $> 99\%$. Per quanto riguarda le specie di strongili presenti, le coproculture effettuate prima del trattamento hanno evidenziato la presenza di *Cyathostomum* spp., *Poteriostomum* spp., *Triodontophorus* spp. e *S. vulgaris*; in seguito al trattamento antiparassitario sono state rinvenute

larve di terzo stadio appartenenti esclusivamente a *Cyathostomum* spp. Lo studio ha evidenziato che la concentrazione plasmatica dell'EPM, in seguito a somministrazione pour-on, è relativamente maggiore rispetto a quella riportata nelle altre specie animali (Gokbulut et al., 2011). L'epinomectina si è inoltre dimostrata efficace nel controllo delle infezioni sostenute dagli strongili intestinali e la persistenza del farmaco nel pelo, sia nei pressi del sito di applicazione sia in altre regioni, potrebbe prolungare l'azione terapeutica nei confronti degli ectoparassiti. Questo è stato successivamente confermato da Veneziano et al. (2013a) con la totale efficacia verso *Haematopinus asini* per 8 settimane dal trattamento.

Per quanto riguarda i BZ studi effettuati sulla farmacocinetica di queste molecole hanno dimostrato che la velocità di assorbimento nel tratto intestinale degli asini è inferiore rispetto ai cavalli. Il FBZ ed i suoi metaboliti non erano riscontrabili nel plasma degli asini in seguito al trattamento con questa molecola ad una dose di 50 mg/kg p.v. Questo può spiegare la scarsa efficacia del febendazolo nei confronti di *Dictyocaulus arnfieldi* (Taylor e Craig, 1993). Il MBZ somministrato per cinque giorni consecutivi alla dose di 15,2-20 mg/kg ha dimostrato un'efficacia verso *D. arnfieldi*, che variava dal 75% al 100%. Il FBZ ripetuto per tre volte consecutive (il primo trattamento alla dose di 7,5-30 mg/kg ed i successivi due trattamenti alla dose di 15 mg/kg) non si è dimostrato efficace nei confronti di questa parassitosi (Urch e Allen, 1980).

Gokbulut et al. (2006) hanno valutato la disposizione plasmatica e l'escrezione nelle feci dell'ossifendazolo (FBZ.SO), del febendazolo (FBZ) e dell'albendazolo (ABZ), in seguito a somministrazione orale nell'asino. Sette asini sono stati suddivisi in tre gruppi, due costituiti da 2 asini ed 1 costituito da 3 asini. Le formulazioni di FBZ.SO (comprese 275 mg), FBZ (polvere 4%) e ABZ (comprese 600 mg) sono state diluite in 50 ml di acqua distillata e somministrate agli asini tramite l'utilizzo di una sonda nasogastrica al dosaggio di 10 mg/kg p.v. Campioni di sangue sono stati eseguiti prima della somministrazione dei farmaci e successivamente a 1, 2, 4, 8, 12, 20, 24, 32, 48, 72, 96 e 120 ore post trattamento; campioni di feci, sono stati raccolti prima e dopo 8, 12, 24, 32, 48, 76 e 120 ore dai trattamenti. Lo studio ha evidenziato che il FBZ ed i suoi metaboliti (FBZ.SO e FBZ.SO₂) non sono mai stati ritrovati nel plasma in seguito a somministrazione orale; la concentrazione plasmatica del FBZSO è risultata significativamente maggiore rispetto a quella dell'ABZ. Probabilmente questo riflette la maggiore solubilità e di conseguenza il maggiore assorbimento del FBZ.SO rispetto al FBZ e all'ABZ in seguito a

somministrazione *per os* nell'asino (Gokbulut et al., 2006). Sebbene la concentrazione plasmatica del FBZ.SO e dei suoi metaboliti abbia mostrato un profilo simile nell'asino e nel cavallo (McKellar, 2002), il FBZ ed i suoi metaboliti, in seguito a somministrazione orale nell'asino, non sono riscontrabili nel plasma diversamente da quanto avviene nel cavallo (Gokbulut et al., 2006). La disposizione plasmatica dell'ABZ si è mostrata diversa da quella del FBZ e del FBZ.SO. Sebbene il composto primario (ABZ) non sia stato rinvenuto nel plasma in seguito a somministrazione orale nell'asino, sono stati però ritrovati i suoi metaboliti solfossido e sulfone. Inoltre la concentrazione massima e la AUC del metabolita solfossido (0,08 µg e 0,84 µgh/ml), che rappresenta il metabolita farmacologicamente attivo, era significativamente maggiore rispetto al metabolita sulfone (0,04 µg e 0,5 µgh/ml) che, invece, non ha proprietà antielmintiche. Il tempo di raggiungimento della concentrazione massima di farmaco nelle feci (32 ore per il FBZ.SO, 34 ore per il FBZ e 30 ore per l'ABZ) rispecchiano il tempo di transito intestinale in seguito a somministrazione orale negli asini e questi valori sono stati maggiori rispetto a quelli riportati nel cavallo (24 ore per il FBZ e il FBZ.SO) (McKellar et al., 2002). In conclusione lo studio ha evidenziato che, nell'asino, in seguito a somministrazione per via orale alla dose di 10 mg/kg, la concentrazione plasmatica del FBZ.SO è stata significativamente maggiore rispetto a quella dell'ABZ e che il FBZ non viene rinvenuto nel plasma. Le elevate concentrazioni intestinali di queste molecole potrebbero quindi dimostrarsi efficaci nel controllo dei nematodi gastrointestinali, tuttavia le basse concentrazioni plasmatiche dell'ABZ potrebbero non essere efficaci nel controllo degli stadi larvali in migrazione e dei parassiti polmonari (Gokbulut et al., 2006). Ripetute somministrazioni di ABZ, unite alla somministrazione di inibitori metabolici, potrebbero rivelarsi efficaci nel controllo delle larve in migrazione e dei parassiti polmonari, tuttavia questi regimi di somministrazione degli antiparassitari, per poter essere consigliati, dovrebbero essere confermati da ulteriori studi (Gokbulut et al., 2006).

L'efficacia del FBZ sospensione orale (Panacur 10%) nel controllo delle infezioni da parte degli strongili intestinali dell'asino è stata valutata nel corso di una prova clinica di campo (Veneziano et al., 2013b). Quattordici asine meticce, che presentavano una FEC > 150 UPG, sono state suddivise, *at random*, in due gruppi: un gruppo di 7 asine sottoposte a trattamento antiparassitario con FBZ sospensione orale alla dose del cavallo di 7,5 mg/kg P.V. ed un gruppo di 7 asine che non è stato sottoposto a

trattamento antiparassitario e che quindi rappresentava il gruppo controllo. Gli esami coprologici individuali sono stati eseguiti prima dell'inizio della prova (giorno -2) e successivamente al trattamento antiparassitario nei giorni 7, 14, 21, 28, 35, 42, 56 e 63. Prima del trattamento antiparassitario le coproculture hanno evidenziato la presenza di L3 ascrivibili a *Cyathostomum* spp., *Triodonophorus*, spp., *Poteriostomum* spp. e *Strongylus* spp. In seguito al trattamento antiparassitario, la FECR è risultata maggiore del 90% sino al giorno 49; le coproculture hanno evidenziato solo la presenza di alcune L3 appartenenti a *Cyathostomum* spp. Il presente studio ha quindi dimostrato che il FBZ sospensione orale, nell'asino, somministrato alla dose consigliata per i cavalli (7,5 mg/kg) risulta essere sicuro ed efficace nel controllo delle strongilosi intestinali. La disposizione del triclabendazolo nell'asino, indicato per il trattamento di *Fasciola hepatica* negli equidi, è stata confrontata con quella somministrata a 3 cavalli e 3 ponies nel corso di uno studio condotto da Kinabo e Bogan (1988). In seguito a somministrazione *per os* al dosaggio di 12 mg/kg P.V. la concentrazione massima, la biodisponibilità assoluta ed il tempo di dimezzamento, sembrerebbero essere inferiori nell'asino; tuttavia questo dosaggio è quello raccomandato dal "Donkey Sanctuary" (Trawford e Mulugeta, 2008).

In riferimento agli studi sulle tetraidropirimidine, la farmacocinetica, l'escrezione nelle feci e l'efficacia antiparassitaria del PYR sia in formulazione pasta (Strike PYR pamoato pasta, 38%) che granulato (Strike, PYR pamoato, 20%) è stata valutata nel corso di una prova clinica di campo (Gokbulut et al., 2014). Gli asini sono stati suddivisi in tre gruppi da 7 animali ciascuno; un gruppo è stato sottoposto a trattamento antiparassitario con PYR pasta (6,94 mg/kg), un gruppo con PYR granulato (6,94 mg/kg) mentre un gruppo non ha ricevuto alcun trattamento (gruppo controllo). I campioni di sangue sono stati raccolti prima del trattamento antiparassitario (giorno -3) e successivamente al trattamento ai giorni 1, 2, 4, 8, 12, 16, 24, 30, 36, 48, 56, 72, 96, 120 e 144 ore dopo la somministrazione del farmaco; i campioni di feci sono stati raccolti dopo 4, 8, 12, 16, 24, 30, 36, 48, 56, 72, 96, 120 ore. I risultati dello studio hanno dimostrato che il PYR in formulazione pasta è stato rinvenuto nel plasma dalle 2 alle 36 ore successive alla somministrazione mentre il PYR formulazione granulato è stato rinvenuto da 1 a 48 ore e che l'ultima concentrazione plasmatica rilevabile della formulazione pasta era significativamente inferiore rispetto a quella granulato (rispettivamente 36 e 46,29 ore). La concentrazione plasmatica massima e la AUC raggiunte

dalla formulazione pasta (0,09 $\mu\text{g/ml}$ e 2,65 $\mu\text{gh/kg}$) è stata significativamente inferiore ($P < 0,01$) rispetto a quella raggiunta dalla formulazione granulare (0,21 $\mu\text{g/ml}$ e 5,60 $\mu\text{gh/kg}$) in seguito a somministrazione orale. Probabilmente la scarsa dissoluzione della formulazione pasta ne riduce il suo assorbimento rispetto alla formulazione granulato (Gokbulut et al., 2014). I risultati di farmacocinetica ottenuti nell'asino nel corso di questo studio differiscono da quanto precedentemente riportato per il cavallo in seguito a somministrazione *per os* del PYR pasta e granulare (Gokbulut et al., 2001b). Nello studio eseguito sui cavalli il PYR è stato somministrato alla dose di 31,3 mg/kg mentre negli asini è stato somministrato alla dose di 6,94 mg/kg. Le concentrazioni inferiori e il minore MRT del PYR nel cavallo rispecchia la minore biodisponibilità e la ridotta persistenza del farmaco che si ha in questa specie rispetto all'asino (Gokbulut et al., 2014); infatti nelle feci degli asini sottoposti a trattamento antiparassitario è stata dimostrata la presenza del farmaco fino a 120 ore post trattamento (Gokbulut et al., 2014); viceversa nel cavallo il tempo di escrezione del PYR nelle feci si è dimostrato nettamente inferiore (48 ore) (Gokbulut et al., 2001b). Lo studio ha quindi dimostrato, nell'asino, un ridotto assorbimento del PYR a livello plasmatico ed un'alta concentrazione ed una lunga persistenza a livello intestinale in seguito a somministrazione orale. Sebbene l'elevata concentrazione e persistenza del PYR, a livello intestinale, sito in cui risiedono gli stadi adulti di numerosi nematodi, potrebbe rispecchiare un'alta e prolungata efficacia della molecola, i bassi livelli plasmatici che questa raggiunge potrebbero determinare una concentrazione plasmatica subterapeutica (Gokbulut et al., 2014).

In ultimo vi sono studi limitati ma recenti sugli Isochinolonici, in Etiopia, sempre nell'asino, è stata condotta una prova clinica di campo al fine di valutare l'efficacia del praziquantel pasta orale verso le infezioni naturali da parte dei cestodi (Getachew et al., 2013). Nello studio sono stati inclusi quarantaquattro asini naturalmente infettati da cestodi. La positività all'infezione è stata confermata sia attraverso l'osservazione delle uova nelle feci in seguito ad esami coprologici sia attraverso reazione immunoenzimatica (ELISA) per la ricerca degli anticorpi verso i cestodi. Gli asini sono stati suddivisi, *at random*, in due gruppi ognuno formato da 22 animali. Un primo gruppo (gruppo trattamento) è stato trattato sia con praziquantel alla dose raccomandata per i cavalli (1 mg/kg) sia con IVM sempre alla dose raccomandata per i cavalli (200 $\mu\text{g/kg}$); il gruppo controllo è stato, invece, sottoposto esclusivamente al trattamento con

IVM. Entrambi i gruppi, successivamente al primo trattamento antiparassitario, hanno continuato a ricevere un trattamento con IVM, con una cadenza bimensile, al fine di rimuovere la maggior parte dei nematodi intestinali. I campioni di feci sono stati prelevati prima del trattamento antiparassitario e successivamente dopo 2, 4, 8, 12 e 16 settimane mentre i campioni di sangue sono stati prelevati prima del trattamento e successivamente ad 8 e 16 settimane post-trattamento. I sieri sono stati analizzati utilizzando la metodica ELISA descritta da Proudman e Trees (1996) e Getachew et al. (2012a,b). Lo studio ha dimostrato che, nell'asino, il PZQ è altamente efficace (>99%) nel ridurre il numero di uova dei cestodi nelle feci. Un unico asino è risultato positivo due settimane dopo il trattamento antiparassitario; secondo gli autori questo potrebbe essere spiegato o a causa della morte ritardata dei parassiti dovuta ad un sottodosaggio del farmaco o da una contaminazione da parte del gruppo controllo durante le analisi di laboratorio. Inoltre non c'è stata ricomparsa delle uova di cestodi nelle feci nelle 16 settimane successive al trattamento antiparassitario (Getachew et al., 2013). Sebbene ci sia stata una segnalazione che il PZQ non è efficace nei confronti degli stadi immaturi dei cestodi (Harnett, 1988) il presente studio indicherebbe nell'asino o l'efficacia del farmaco nei confronti degli stadi immaturi del parassita o che esisterebbe un periodo di prepatenza maggiore rispetto a quello tipicamente suggerito di 8-10 settimane (French e Chapman, 1992). Un'altra possibile spiegazione che giustificerebbe un periodo di ricomparsa più lungo del previsto è che il trattamento antiparassitario è stato eseguito durante un periodo dell'anno in cui le condizioni ambientali non sono favorevoli allo sviluppo ed alla sopravvivenza degli ospiti intermedi (acari oribatidi) e quindi non potrebbe avvenire la reinfezione. Gli esami sierologici (ELISA) hanno inoltre dimostrato una marcata diminuzione dei livelli di anticorpi circolanti nel siero degli asini trattati; un risultato analogo è stato ottenuto anche nei cavalli (Abbott et al., 2008). La variazione individuale nella diminuzione dei livelli anticorpali, nei singoli asini, potrebbe essere attribuita sia al livello anticorpale naturale di ogni soggetto sia all'intensità dell'infezione prima del trattamento antiparassitario mentre non è possibile che il trattamento antiparassitario non sia risultato efficace considerato che la diminuzione delle uova di cestodi nelle feci è stata del 100% (Getachew et al., 2013).

Bibliografia

- Abbott, J.B., Mellor, D.J., Barrett, E.J., Proudman, C.J., Love, S. (2008). Serological changes observed in horses infected with *Anoplocephala perfoliata* after treatment with praziquantel and natural reinfection. *Veterinary Record*, 162: 50-53.
- Afzal, J., Burke, A., Batten, P., DeLay, R., Miller, P. (1997). Moxidectin: Metabolic fate and blood pharmacokinetics of ¹⁴C-labeled moxidectin in horses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45: 3627-3633.
- Arundel, J (1983). Veterinary anthelmintics. *School of Veterinary Science*, University of Melbourne, pp. 1-22.
- Aubry, M.L.; Cowell, P., Davey, M.J., Shevde, S. (1970). Aspects of the pharmacology of a new anthelmintics: Pyrantel. *British Journal of Pharmacology*, 38: 332.
- Averkin, E., Beard, C., Dvorak, C., Edwards, J., Fried, J., Schiltz, R., Kistner, T.P., Drudge, J.H., Lyons, E.T., Sharp, M.L., Corvin, R.M. (1975). Methyl 5(6)-phenylsulfanyl-2-benzimidazole carbamate: a new potent anthelmintic. *Journal of Medical Chemistry*, 19: 1164-1166.
- Baeder, C., Bahr, H., Christ, O., Duwel, D., Kellner, H.M., Kirsch, R., Loewe, H., Schultes, E., Schutz, E., Welsen, H. (1974). Fenbendazole: A new high effective anthelmintic. *Experientia*, 30: 753-754.
- Bariden, K., Davies, H.S., Gibson, N.R., Hood, A.J.O., Parker, L.D. (2006). Efficacy of moxidectin 2 per cent oral gel against cyathostomins, particularly third-stage inhibited larvae, in horses. *Veterinary Record*, 158: 766-768.
- Barrowman, M.M., Marriner, S.E., Bogan, J.A. (1984). The binding nad subsequent inhibition of tubulin polymerisation in *Ascaris suum* (in vitro) by benzimidazoles anthelmintics. *Biochemical Pharmacology*, 33: 3037-3040.
- Becker, W. (1975). Die advendung von Panacur bei trachtigen Tieren. In: 2nd European multi colloquium of parasitology. Trogir, Yugoslavia. pp. 105-106.
- Becher, A.M., Mahling, M., Nielsen, M.K., Pfister, K. (2010). Selective anthelmintic therapy of horses in the Federal states of Bavaria(Germany) and Salzburg (Austria): an investigation into strongyle eggshedding consistency. *Veterinary Parasitology*, 171: 116-122.
- Benz, G.W., Roncalli, R.A., Gross, S.J. (1989). Use of ivermectine in cattle, sheep, goat and swine. In *Ivermectin and Abamectin*, Ed. Campbell, W.C. pp. 215-230. New York: Springer-Verlag.
- Blane, D. (1826). *The Outlines of the Veterinary Art*, 3rd edn, Compton and Ritchie Printers.
- Brown, H.D., Matzak, A.R., Ilves, I.R. (1961). Antiparasitic drugs IV. 2-(4'-thiazolyl)-benzimidazole: a new anthelmintic. *Journal of American Chemical Society*, 83: 1764-1765.
- Brugman, J.P., Thienpoint, D.C., Van Wijngarden, I., Van Parys, O.F., Schuermans, V.L., Lauwers, H.L. (1971). Mebendazole in enterobiasis. Radiochemical and pilot clinical study in 1278 subjects. *Journal of American Medical Association*, 217: 313-316.
- Burke, J.M., Kaplan, R.M., Miller, J.E., Terrill, T.H., Getz, W.R., Mobini, S., Valencia, E., Williams, M.J., Williamson, L.H., Vatta, A.F. (2007). Accuracy of the FAMACHA system for on-farm use by sheep and goat producers in the southeastern United States. *Veterinary Parasitology*, 147: 89-95.

- Bjorn, H., Hennessy, D.R., Friis, C. (1996). The kinetic disposition of pyrantel citrate and pamoate and their efficacy against ivermectin-resistant *Oesophagostomum dentatum* in pigs. *International Journal for Parasitology*, 26, 1375-1380.
- Cameron, W.M. (1926). On the Morphology of the adults and the free living larvae of *Dictyocaulus arnfieldi*, the lung-worm of equines. *Journal of Helminthology*, 4:61-68.
- Campbell, W.C. (1989). Ivermectin and Abamectin. Springer-Verlag, New York.
- Campbell, W.C. e Benz, G.W. (1984). Ivermectin: a review of efficacy and safety. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 7: 1-16.
- Campbell, W.C., Leaning, W.H., Seward, R.L. (1989). Use of ivermectine in horses. In *Ivermectin and Abamectin*, ed. Campbell, W.C. pp. 234-244. New York, Springer-Verlag.
- Chiu, S.H. e Lu, A.Y. (1989). Metabolism nad tissue residues. In: *Ivermectin and Abamectin*, ed. Campbell, W.C. pp. 131-144. New York: Springer-Verlag.
- Cobb, R. e Boeckh, A. (2009). Moxidectin: a review of chemistry, pharmacokinetics and use in horses. *Parasites & Vectors*, 2(2): <https://doi.org/10.1186/1756-3305-2-S2-S5>.
- Coles, G.C., Hillyer, M.H., Taylor, F.G.R., Parker, L.D. (1998). Activity of moxidectin against bots and lungworm in equids. *Veterinary Record*, 143: 169-170.
- Conder, G.A. e Campbell, W.C. (1995). Chemoterapy of nematode infections of veterinary importance, with special reference to drug resistance. *Advances in Parasitology*, 35: 1-84.
- Courtney, C.H. e Robertson, E.L. (1997). Chemotherapy of parasitic diseases. In *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. Ed. Adams, H.R. pp. 885-932. Iowa State University.
- Cringoli, G., Veneziano, V., Jackson, F., Vercruyssen, J., Greer, A.W., Fedele, V., Mezzino, L. Rinaldi, L. (2008). Effects of strategic anthelmintic treatments on the milk production of dairy sheep naturally infected by gastrointestinal strongyles. *Veterinary Parasitology*, 156: 340-345.
- Crofton, H.D. (1971). Quantitative approach to parasitism. *Parasitology*, 62:179-193.
- Cully, D.F., Vassilatis, D.K., Liu, K.K., Pares, P.S., van der Ploeg, L.H., Schaeffer, J.M., Arena, J.P. (1994). Cloning of an avermectin-sensitive glutamate-gated chloride channel from *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 371: 707-711.
- Danielson, P. (2002). The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in human. *Current Drug Metabolism*, 3(6): 561-597.
- Delatour, P. e Euzeby, J. (1983). Communautés structural, més structural, métabolique et anthelminthique entre febantel, fenbendazole et oxfendazole. *Le Point Vétérinaire*, 15: 63-67.
- Di Loria, A., Veneziano, V., Piantedosi, D., Rinaldi, L., Cortese, L., Mezzino, L., Cringoli, G., Ciaramella, P. (2009). Evaluation of FAMACHA system for detecting the severity of anaemia in sheep from southern Italy. *Veterinary Parasitology*, 16(1-2): 53-59.
- DiPietro, J.A., Hutchens, D.E., Lock, T.F., Walker, K., Paul, A.J., Shipley, C., Rulli, D. (1997). Clinical trial of moxidectin oral gel in horses. *Veterinary Parasitology*, 72(2): 167-177.
- Dopfer, D., Kerssens, C.M., Meijer, Y.G., Boersema, J.H., Eysker, M. (2004). Shedding consistency of strongyle-type eggs in Dutch boardinghorses. *Veterinary Parasitology*, 124: 249-258.

- Dorchies, P., De Lahitte, J.D., Flochlay, A., Bond-Riou, F. (1998). Efficacy of moxidectin 2% equine gel against natural nematode infections in ponies. *Veterinary Parasitology*, 74: 85-89.
- Drudge, J.H. e Lyons, E.T. (1966). Control of internal parasites of horses. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 148: 378-383.
- Drudge, J.H., Lyons, E.T., Tolliver, S.C., Kubis, J.E. (1981). Clinical trials of oxbendazole for control of equine internal parasites, including benzimidazole-resistant small strongyle.
- Duncan, J.L., McBeath, D.G., Preston, N.K. (1980). Studies on the efficacy of fenbendazole used in a divided dosage regime against strongyle infections in ponies. *Equine Veterinary Journal*, 12: 78-80.
- Duncan, J.L., e Love, S. (1991). Preliminary observations on an alternative strategy for the control of horse strongyles. *Equine Veterinary Journal*, 23: 226-228.
- Egerton, J.R., Ostlind, D.A., Blair, L.S., Eary, C.H., Suhayda, D., Cifelli, S., Riek, R.F., Campbell, W.C. (1979). Avermectins, new family of potent anthelmintic agent: efficacy of the B_{1a} component. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*, 15: 372-378.
- Faulkner, J.K., Figdor, S.K., Monro, A.M., Schach, V.W., Stopher, D.A., Wood, B.A. (1972). The comparative metabolism of pyrantel in five species. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 23: 79-91.
- French, D.D. e Chapman, M.R. (1992). Tapeworms of the equine gastrointestinal tract. *Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarians*, 14: 655-661.
- Galvani, A.P. (2003). Immunity, antigenic heterogeneity, and aggregation of helminth parasites. *International Journal for Parasitology*, 89: 232-241.
- Geary, T.G., Klein, R.D., Vanover, L., Bowman, J.W., Thompson, D.P. (1992). The nervous system of helminths as targets for drugs. *Journal of Parasitology*, 72: 215-230.
- Getachew, A.M., Innocent, G., Trawford, A.F., Reid, S.W.J., Love, S. (2012a). Gasterophilosis: a major cause of rectal prolapse in working donkeys in Ethiopia. *Tropical Animal Health and Production*, 44: 757-762.
- Getachew, A.M., Innocent, G., Proudman, C.J., Trawford, A., Feseha, G., Reid, S.W., Burden, F., Love, S. (2012b). Equine cestodosis: a sero-epidemiological study of *Anoplocephala perfoliata* infection in Ethiopia. *Veterinary Research Communications*, doi: 10.1007/s11259-012-9516-1 (online first).
- Getachew, A.M., Innocent, G., Proudman, C.J., Trawford, A., Feseha, G., Reid, S.W.J., Faith, B., Love, S. (2013). Field efficacy of praziquantel oral paste against naturally acquired equine cestodes in Ethiopia. *Parasitology Research*, 112: 141-146.
- Gokbulut, C., Nolan, A.M., McKellar, Q.A. (2001a). Plasma pharmacokinetics and faecal excretion of ivermectin, doramectin and moxidectin after oral administration in horses. *Equine Veterinary Journal*, 33: 494-498.
- Gokbulut, C., Nolan, A.M., McKellar, Q.A. (2001b). Pharmacokinetic disposition and faecal excretion of pyrantel embonate following oral administration in horses. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 24: 77-79.
- Gokbulut, C., Boyacioglu, M., Karadeir, U. (2005). Plasma pharmacokinetics and faecal excretion of ivermectin (Evalan[®] paste) and doramectin (Dectomax[®] 1%) following oral administration in donkeys. *Research in Veterinary Science*, 79: 233-238.
- Gokbulut, C., Akar, F., McKellar, Q.A. (2006). Plasma disposition and faecal excretion of oxfendazole, fenbendazole and albendazole following oral administration to donkeys. *Veterinary Journal*, 176: 166-172.

- Gokbulut, C., Di Loria, A., Gunay, N., Masucci, R., Veneziano, V. (2011). Plasma disposition, concentration in the hair, and anthelmintic efficacy of eprinomectin after topical administration in donkeys. *American Journal of Veterinary Research*, 72(12): 1639-1645.
- Gokbulut, C., Naturali, S., Rufrano, D., Anastasio, A., Yalinkilinc, H.S., Veneziano V. (2012). Plasma disposition and milk excretion of eprinomectin following pour-on administration in lactating donkeys. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutic*, 36: 302-305.
- Gokbulut, C., Aksit, D., Smaldone, G., Mariani, U., Veneziano, V (2014). Plasma pharmacokinetics, faecal excretion and efficacy of pyrantel pamoate pasta and granule formulations following per os administration in donkeys naturally infected with intestinal strongylidae. *Veterinary Parasitology*, 205(1-2): 186-192.
- Gomez, H.H. e Georgi, J.R. (1991). Equine helminth infections: Control by selective chemotherapy. *Equine Veterinary Journal*, 23: 198-200.
- Grosenbaugh, D.A., Reinemeyer, C.R., Figueiredo, M.D. (2011). Pharmacology and therapeutics in donkeys. *Equine Veterinary Education*, 23(10): 523-530.
- Hall, M.C. (1917). Notes in regard to bots, *Gasterophilus* spp. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 52: 177-184.
- Hall, M.C., Wilson, R.H., Wigdor, M. (1918). The anthelmintic treatment of equine intestinal strongylidosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 54: 47-55.
- Harnett, W. (1988). The anthelmintic action of praziquantel. *Parasitology Today* 4:144-146
- Harrow, I.D. e Gartion, K.A.F. (1985). Mode of action of anthelmintics morantel, pyrantel and levamisole on muscle-cell membrane of nematode *Ascaris suum*. *Pesticide Science*, 16: 662-672.
- Herd, R.P. e Majewky, G.A. (1994). Comparison of daily and monthly pyrantel treatment in yearling Thoroughbreds and the protective effect of strategic medication of mares and their foals. *Veterinary Parasitology*, 55: 93-104.
- Hoff, D.R., Fisher, M.H., Bochis, R.J., Lusi, A., Waksmunski, F., Egerton, J.R., Yakstis, J.J., Cuckler, A.C., Campbell, W.C. (1970). A new broad spectrum anthelmintic 2-(4-thiazolyl)-5-isopropoxycarbonylamino benzimidazole. *Experientia*, 26: 550-551.
- Horspool, L.J.I. e McKellar, Q.A. (1990). Disposition of oxytetracycline in horses, ponies and donkeys after intravenous administration. *Equine Veterinary Journal*, 22: 284-285.
- Horspool, L.J.I., Taylor, D.J., McKellar, Q.A. (1994). Plasma disposition of amikacin and interactions with gastrointestinal microflora in *Equidae* following intravenous and oral administration. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 17: 291-298.
- Hotson, I.K. (1983). The development of ivermectin as an antiparasitic agent in sheep. In: *Proceeding of the MSD AGVET Symposium on Recent Development in the Control of Animal Parasites*, pp. 42-48. XXII World Veterinary Congress, Perth, Australia.
- Imam, S.M.A., Seri, H.I., Hassan, T., Tigani, T.A., Zolain, H.B., Abakar, A.D. (2010). Therapeutic efficacy evaluation of anthelmintic activity of albendazole and ivermectin drench formulations in donkeys in Darfur, Sudan. *Veterinary Archives*, 80: 585-595.
- Jacobs, D.E., Hutchinson, M.J., Parker, L., Gibbons, L.M. (1995). Equine cyathostome infection: suppression of faecal egg output with moxidectin. *Veterinary Record*, 137: 545.

- Jones, R.M., Logan, N.B., Weatherley, A.J., Little, A.S., Smothers, C.D. (1993). Activity of doramectin against nematode endoparasites of cattle. *Veterinary Parasitology*, 49: 27-37.
- Kaplan, R.M. (2002). Anthelmintic resistance in nematodes of horses. *Veterinary Research*, 33(5): 491-507.
- Kaplan, R.M. e Nielsen, M.K. (2010). An evidence-based approach to equine parasite control: It ain't the 60s anymore. *Equine Veterinary Education*, 22: 306-316.
- Kates, K.O., Colglazier, M.L., Enzie, F.D. (1975). Oxibendazole: critical anthelmintic trials in equids. *Veterinary Record*, 97: 442-444.
- Kennedy, M.J. e Phillips, F.E. (1993). Efficacy of doramectin against eyeworms (*Thelazia* spp.) in naturally infected and experimentally infected cattle. *Veterinary Parasitology*, 49: 61-66.
- Kenyon, F., Greer, A.W., Coles, G.C., Cringoli, G., Papadopoulos, E., Cabaret, J., Berrag, B., Varady, M., van Wyk, J.A., Thomas, E., Vercuysse, J., Jackson, F. (2009). The role of targeted selective treatments in the development of refugia-based approaches to the control of gastrointestinal nematodes of small ruminants. *Veterinary Parasitology*, 164: 3-11.
- Kinabo, L.D.B. e Bogan, J.A. (1989). Disposition of triclabendazole in horses, ponies and donkeys. *Equine Veterinary Journal*, 21: 305-307.
- Klei, T.R., Chapman, M.R., French, D.D., Taylor, H.W. (1993). Evaluation of ivermectin at an elevated dose against encysted equine cyathostome larvae. *Veterinary parasitology*, 47: 99-106.
- Krecek, R.C., Guthrie, A.J., Nieuwenhuizen, L.C.v., Booth, L.M. (1994). A comparison between the effects of conventional and selective antiparasitic treatments on nematode parasites of horses from two management schemes. *Journal of South African Veterinary Association*, 65(3): 97-100.
- Lacey, E. e Gill, J.H. (1994). Biochemistry of benzimidazole Resistance. *Acta Tropica*, 56: 245-262.
- Lankas, G.R. e Gordon, L.R. (1989). Toxicology. In: Ivermectin and Abamectin, ed. Campbell, W.C., pp 89-112. New York: Springer-Verlag.
- Lanusse, C.E. e Prichard, R.K. (1993). Relationship between pharmacological properties and clinical efficacy of ruminant anthelmintics. *Veterinary Parasitology*, 49: 123-158.
- Lanusse, C., Lifschitz, A., Virkel, G., Alvarez, L., Sanchez, S., Sutra, J.F., Galtier, P., Alvinerie, M. (1997). Comparative plasma disposition kinetics of ivermectin, moxidectin and doramectin in cattle. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 20: 91-99.
- Leaning, W.H., Roncalli, R.A., Brokken, E.S. (1983). The efficacy and safety evaluation of ivermectin: a new injectable antiparasitic agent for cattle. In: Proceeding of the MSD AGVET Symposium on Recent Development in the Control of Animal Parasites, pp. 25-41. XXII World Veterinary Congress, Perth, Australia.
- Lester, H.E., Bartley, D.J., Morgan, E.R., Hodgkinson, J.E., Stratford, C.H., Matthews, J.B. (2013). A cost comparison of faecal egg count-directed anthelmintic delivery versus interval programme treatments in horses. *Veterinary Record*, 173: 15.
- Lia, R.P., Mutafchiev, Y., Veneziano, V., Giannelli, A., Abramo, F., Santoro, M., Latrofa, M.S., Cantacessi, C., Martin, C., Otranto, D., Bertuglia, A., Riccio, B. (2017). Filarial infection caused by *Onchocerca boehmi* (Supper, 1953) in a horse from Italy. *Parasitology Research*, 116(1): 191-198.

- Little, D., Flowers, J.R., Hammerberg, B.H., Gardner, S.Y. (2003). Management of drug resistant cyathostomiasis on a breeding farm in central North Carolina. *Equine Veterinary Journal*, 35: 246-251.
- Lizzaraga, I., Sumano, H., Brumbaugh, G.W. (2004). Pharmacological and pharmacokinetic differences between donkeys and horses. *Equine Veterinary Education*, 16(2): 102-112.
- Lloyd, S., Smith, J., Connan, R.M., Hatcher, M.A., Hedges, T.R., Humphrey, D.J., Jones, A.C. (2000). Parasite control methods used by horse owners: Factors predisposing to the development of anthelmintic resistance in nematodes. *Veterinary Record*, 146: 487-492.
- Logan, N.B., Weatherley, A.J., Phillips, F.E., Wilkins, C.P., Shanks, D.J. (1993). Spectrum of activity of doramectin against cattle mites and lice. *Veterinary Parasitology*, 49: 67-73.
- Lyons, E.T., Drudge, J.H., Tolliver, S.C., Granstrom, D.E., Stamper, S. (1992). Evaluation of exclusive use of ivermectin vs alternation of antiparasitic compounds for control internal parasites of horses. *American Journal of Veterinary Research*, 53: 97-104.
- Lyons, E.T., Tolliver, S.C., Drudge, J.H., Stamper, S., Swerczek, T.W., Granstrom, D.E. (1996). Clinical test evaluation (1977-1992) of drug efficacy against endoparasites featuring benzimidazole-resistant small strongyle (population S) in Shetland ponies. *Veterinary Parasitology*, 66: 67-73.
- Lyons, E.T., Tolliver, S.C., Drudge, J.H. (1999). Historical perspective of cyathostomes: Prevalence, treatment and control programs. *Veterinary Parasitology*, 85: 97-112.
- Lyons, E.T., Tolliver, S.C., Collins, S.S. (2009). Probable reason why small strongyle EPG counts are returning early after ivermectin treatment of horses on a farm in Central Kentucky. *Parasitology Research*, 104: 569-574.
- Lyons, E.T., Tolliver, S.C., Kuzmina, T.A. (2012). Investigation of strongyle EPG values in horse mares relative to known age, number positive, and level of egg shedding in field studies on 26 farms in Central Kentucky (2010-2011). *Parasitology Research*, 110(6): 2237-2245.
- Malan, F.S. e Reinecke, R.K. (1979). Anthelmintic efficiency of febendazole in equine. *Journal of the South African Veterinary Association*, 50: 255-258.
- Malan, F.S., van Wyk, J.A., Wessels, C.D. (2001). Clinical evaluation of anaemia in sheep: early trials. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 61: 165-174.
- Marchiondo, A.A., White, G.W., Smith, L.L., Reinemeyer, C.R., Dascanio, J.J., Johnson, E.G., Shugart, J.I. (2006). Clinical field efficacy and safety of pyrantel pamoate paste (19,13% w/w pyrantel base) against *Anoplocephala* spp. in naturally infected horses. *Veterinary Parasitology*, 137(1-2): 94-102.
- Marriner, S.E. e Bogan, J.A. (1985). Plasma concentration of febendazole and oxfendazole in the horse. *Equine Veterinary Journal*, 17: 58-61.
- Martin, R.J. (1997). Modes of action of anthelmintic drugs. *Veterinary Journal*, 154: 11-34.
- Martin, J.R. e Pennington, A.J. (1989). A patch-clamp study of effects of dihydroavermectin on *Ascaris* muscle. *British Journal of Pharmacology*, 98: 747-756.
- Martin, R.J., Bai, G., Clark, C.L., Robertson, A.P. (2003). Methyridine (2-[2-methoxyethyl]-pyridine) and levamisole activate different ACh receptor subtypes in

- nematode parasites: a new lead for levamisole-resistance. *British Journal of Pharmacology*, 140: 1068–1076.
- Martin, R.J., Clark, C.L., Trailovic, S.M., Robertson, A.P. (2004). Oxantel Is an *N*-type (methyridine and nicotine) agonist not an *L*-type (levamisole & pyrantel) agonist: classification of cholinergic anthelmintics. *International Journal for Parasitology*, 34: 1083–1090.
- Martin, R.J., Verma, S., Levandoski, M., Clarck, C.L., Qian, H., Stewart, M., Robertson, A.P. (2005). Drug resistance and neurotransmitter receptors of nematodes: recent studies on the mode of action of levamisole. *Parasitology*, 131: S71-S84.
- Matthee, S. e McGeoch, M.A. (2004). Helminths in horses: use of selective treatment for the control of strongyles. *Journal of the South African Veterinary Association*, 75: 129–136.
- Matthew, J. e Lester, H.E. (2015). Control of equine nematodes: making the most of faecal egg counts. *In Practice*, 37: 540-544.
- Matthews, N.S., Taylot, T.S., Hartsfield, S.M. (1997). Anaesthesia of donkeys and mules. *Equine Veterinary Education*, 9: 198-202.
- Matthews, J.B. e Burden, F. (2013). Common helminth infections of donkeys and their control in temperate regions. *Equine Veterinary Education*, 25(9): 461-467.
- McKellar, Q.A. e Benchaoui, H.A. (1996). Avermectins and milbemycins. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 19: 331-351.
- McKellar, Q.A., Gokbulut, C., Muzandu, K., Benchaoui, H. (2002). Fenbendazole pharmacokinetics, metabolism, and potentiation in horses. *Drug Metabolism and Disposition*, 30: 1230-1239.
- McKissick, G.E., Sutherland, I.H., Foix, J., Olson, G. (1987). The safety of ivermectin administered orally to pregnant mares. *Equine Veterinary Science*, 7: 357-367.
- Mealey, K.L., Matthews, N.S., Peck, K.E., Ray, A.C., Taylor, T.S. (1997). Comparative pharmacokinetics of phenylbutazone and its metabolite oxyphenbutazone in clinically normal horses and donkeys. *American Journal of Veterinary Research*, 58: 53-55.
- Miller, J.A., Oehler, D.D., Scholl, P.J. (1994). Moxidectin: pharmacokinetics and activity against horn flies (Diptera: Muscidae) and trichostrongyle nematode egg production. *Veterinary Parasitology*, 53: 133-143.
- Mirck, M.H. (1985). Chemotherapy of gastrointestinal nematodiasis in equi. *In Chemotherapy of Gastrointestinal Helminths*. EDS. Bossche, H.V., Thienpont, D. and P.G. Janssen: 443-462.
- Monahan, C.M., Chapman, M.R., French, D.D., Klei, T.R. (1995). Efficacy of moxidectin oral gel against *Onchocerca cervicalis* microfilariae. *Journal of Parasitology*, 81: 117-118.
- Nawalinski, T. e Theodorides, V.J. (1976). Critical tests with oxibendazole against gastrointestinal parasites of ponies. *American Journal of Veterinary Research*, 37: 469-471.
- Nawalinski, T. e Theodorides, V.J. (1977). Efficacy of three forms of oxibendazole against gastrointestinal parasites of ponies. *Veterinary Medicine Small Animal Clinician*, 72: 96-101.
- Neal, M.J. (2002). *Medical Pharmacology at a Glance*, 4th edn. Blackwell Publishing, Malden. p. 89.

- Nielsen, M.K., Haaning, N., Olsen, S.N. (2006a). Strongyle egg shedding consistency in horses on farms using selective therapy in Denmark. *Veterinary Parasitology*, 135: 333–335.
- Nielsen, M.K., Monrad, J., Olsen, S.N. (2006b). Prescription only anthelmintics — a questionnaire survey on strategies for surveillance and control of equine strongyles in Denmark. *Veterinary Parasitology*, 135: 47–55.
- Nielsen, M.K., Kaplan, R.M., Thamsborg, S.M., Monrad, J., Olsen, S.N. (2007). Climatic influences on development and survival of free-living stages of equine strongyles: implications for worm control strategies and managing anthelmintic resistance. *Veterinary Journal*, 174: 23–32.
- Nielsen, M.K., Baptiste, K.E., Tolliver, S.C., Collins, S.S., Lyons, E.T. (2010). Analysis of multiyear studies in horses in Kentucky to ascertain whether counts of eggs and larvae per gram of feces are reliable indicators of numbers of strongyles and ascarids present. *Veterinary Parasitology*, 174: 77–84.
- Nielsen, M.K., Olsen, S.N., Lyons, E.T., Monrad, J., Thamsborg, S.M. (2012a). Real-time PCR evaluation of *Strongylus vulgaris* in horses on farms in Denmark and Central Kentucky. *Veterinary Parasitology*, 190: 461–466.
- Nielsen, M.K., Vidyashankar, A.N., Olsen, S.N., Monrad, J., Thamsborg, S.M. (2012b). *Strongylus vulgaris* associated with usage of selective therapy on Danish horse farms – is it reemerging. *Veterinary Parasitology*, 189: 260–266.
- Nielsen, M.K., Mittel, L., Grice, A., Erskine, M., Graves, E., Vaala, W., Tully, R.C., French, D.D., Bowman, R., Kaplan, R.M. (2013). AAEP Parasite Control Guidelines. *American Association of Equine Practitioners*, Online at www.aaep.org.
- Nielsen, M.K., Pfister, K., von Samson-Himmelstjerna, G. (2014a). Selective therapy in equine parasite control – Application and limitations. *Veterinary Parasitology*.
- Nielsen, M.K., Reist, M., Kaplan, R., Pfister, K., van Doorn, D., Becher, A. (2014b). Equine parasite control under prescription only conditions in Denmark—Awareness, knowledge, perception, and strategies applied. *Veterinary Parasitology*, 204: 64–72.
- Nielsen, M.K., Pfister, K., von Samson-Himmelstjerna, G. (2014c). Selective therapy in equine parasite control – application and limitations. *Veterinary Parasitology*, 202: 95–103.
- O'Meara, B. & Mulcahy, G. (2002). A survey of helminth control practices in equine establishments in Ireland. *Veterinary Parasitology*, 109: 101–110.
- Parkinson, A. (1996). An overview of current cytochrome P450 technology for assessing the safety and efficacy of new materials. *Toxicologic Pathology*, 24: 45–57.
- Peck, S.C., Mealey, K.L., Matthews, N.S., Taylor, T.S. (1997). Comparative pharmacokinetics of caffeine and three metabolites in clinically normal horses and donkeys. *American Journal of Veterinary Research*, 58: 881–884.
- Perez, R., Cabezas, I., Sutra, J.F., Galtier, P., Alvinerie, M. (2001). Faecal excretion profile of moxidectin and ivermectin after oral administration in horses. *The Veterinary Journal*, 161: 85–92.
- Prichard, R.K. (1970). Mode of action of the anthelmintic thiabendazole in *Haemonchus contortus*. *Nature*, 228: 684–685.
- Prichard, R.K. (1973). The fumarate reductase reaction of *Haemonchus contortus* and the mode of action of some anthelmintics. *International Journal for Parasitology*, 3: 409–417.

- Prichard, R., Ménez, C., Lespine, A. (2012). Moxidectin and avermectins: Consanguinity but not identity. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 2: 134-153.
- Proudman, C.J. e Trees, A.J. (1996). Correlation of antigen specific IgG and IgG(T) responses with *A. perfoliata* infection intensity in the horse. *Parasite Immunology*, 18: 499-506.
- Randi, R. (1984). The use of ivermectin in horse: Research and clinical observations. *The Compendium on Continuing Education*, 6: 516-522.
- Reinemeyer C.R. e Rohrbach, B.W. (1990). A survey of equine parasite control practices in Tennessee. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 196: 712-716.
- Reinemeyer, C.R., Hutchens, D.E., Eckblad, W.P., Marchiondo, A.A., Shugart, J.I. (2006). Dose-confirmation studies of the cestocidal activity of pyrantel pamoate paste in horses. *Veterinary Parasitology*, 138: 234-239.
- Reinemeyer, C.R., Prado, J.C., Nichols, E.C., Marchiondo, A.A. (2010). Efficacy of pyrantel pamoate and ivermectin paste formulations against naturally acquired *Oxyuris equi* infections in horses. *Veterinary Parasitology*, 171: 106-110.
- Relf, V.E., Morgan, E.R., Hodgkinson, J.E., Matthews, J.B. (2013). Helminthegg excretion with regard to age, gender and management practices on UK Thoroughbred studs. *Parasitology*, 140: 641-652.
- Roberson, E.L. (1988). Antinematodal Drugs. In *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, ed. N.H. Booth and L.E. McDonald, pp. 882-927. Ames: Iowa State University Press.
- Robertson, A.P., Clark, C.L., Burns, T.A., Thompson, D.P., Geary, T.G., Trailovic, S.M., Martin, R.J. (2002). Paraherquamide and 2-deoxy-paraherquamide distinguish cholinergic receptor subtypes in *Ascaris* muscle. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 302: 853-860.
- Salas-Romero, J., Gómez-Cabrera, K.A., Aguilera-Valle, L.A., Bertot, J.A., Salas, J.E., Arenal, A., Nielsen, M.K. (2017). Helminth egg excretion in horses kept under tropical conditions – Prevalence, distribution and risk factors. *Veterinary Parasitology*, 243: 256-259.
- Sangster, N.C., Song, J., Demeler, J. (2005). Resistance as a tool for discovering and understanding targets in parasite neuromusculature. *Parasitology*, 131: S179-S190.
- Schroder, J., Swan, G.E., Barrick, R.A., Pulliam, J.D. (1986). Effect of ivermectin on the reproductive potential of breeding rams. *Journal of South African Veterinary Association*, 57: 211-213.
- Schumacher, J. e Taintor, J. (2008). A review of the use of the moxidectin in horses. *Equine Veterinary Education*, 20(10): 546-551.
- Sharma, R.K., Singh, K., Saxena, K.K. (1989). The effect of levamisole and albendazole on some enzymes of *Ascaridia galli* and *Heterakis gallinea*. *Veterinary Parasitology*, 30: 213-222.
- Shoop, W.L., Ostlind, D.A., Rohrer, S.P., Mickle, G., Haines, H.W., Michael, B.F., Mrozik, H., Fisher, M.H. (1995). Avermectins and milbemycins against *Fasciola hepatica*: in vivo drug efficacy and in vitro receptor binding. *International Journal for Parasitology*, 25: 923-927.
- Squires, E.L., Amann, R.P., Pickett, B.W., Berndtson, W.E., Shideler, R.K., Vos, J.L. (1978). Effect of febendazole on reproductive function in stallions. *Theriogenology*, 9: 447-455.

- Sreter, T., Molnar, V., Kassai, T. (1994). The distribution of nematode eggcounts and larval counts in grazing sheep and their implications for parasite control. *Internal Journal of Parasitology*, 24: 103-108.
- Takiguchi, Y., Mishna, H., Okuda, M., Tereda, M. (1980). Milbemycins, a new family of macrolide antibiotics: fermentation, isolation and physico-chemical properties. *Journal of Antibiotics*, 33: 1120-1127.
- Taylor, T.S. e Craig, T.M. (1993). Lungworms in donkeys: evaluation of anthelmintics under field conditions. *Journal of Equine Veterinary Science*, 13: 150-152.
- Tejeda, P., Sanchez-Moreno, M., Monteoliva, M., Gomez-Banqueri, H. (1987). Inhibition of malate dehydrogenase enzymes by benzimidazole anthelmintics. *Veterinary Parasitology*, 24: 269-274.
- Tex, S., Taylor, M., Craig, T.M. (1993). Lungworms in donkeys: evaluation of anthelmintics under field conditions. *Journal of Equine Veterinary Science*, 3: 150-152
- Theodorides, V.J., Chang, J., Di Cuiollo, C.J., Grass, G.M., Parish, R.C., Scott, G.C. (1973). Oxibendazole: a new broad spectrum anthelmintic effective against gastrointestinal nematodes of domestic animals. *American Journal of Veterinary Research*, 30: 702-703.
- Theodorides, V.J. (1985). *Parasitology for Veterinary*: Ed: W.B. Saunders Company, Philadelphia.
- Trawford, A.F. e Tremlett, J.G. (1996). Efficacy of triclabendazole against *Fasciola hepatica* in the donkey (*Equus asinus*). *Veterinary Record*, 139: 142-143.
- Trawford, A.F. e Mulugeta, G. (2008). Parasites. In: *The Professional Handbook of the Donkey*, 4th edn. Ed. Svendsen, E.D., Whittet Books, Wiltshire, UK, pp. 82-110.
- Turner, M.J. e Schaeffer, J.M. (1989). Mode of action of ivermectin. In: *Ivermectin and Abamectin*, ed. Campbell, W.C., pp. 73-88. New York, Springer-Verlag.
- Tzelos, T. e Matthews, J. (2016). Anthelmintic resistance in equine helminth and mitigating its effects. *In Practice*, 38: 489-499.
- Uhlinger, C. (1993). Uses of fecal egg count data in equine practice. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, 15: 742-748.
- Urch, D.L. e Allen, W.R. (1980). Studies on fenbendazole for treating lung and intestinal parasites in horses and donkeys. *Equine Veterinary Journal*, 12: 74-77.
- Valdez, R.A., Dipietro, J.A., Paul, A.J., Lock, T.F., Hungerford, L.L., Todd, K.S. (1995). Controlled efficacy study of the bioequivalence of Strongid C and generic pyrantel tartrate in horses. *Veterinary Parasitology*, 60: 83-102.
- Van den Bossche, H. (1982). The molecular basis of anthelmintic action. In *Comparative Biochemistry of Parasites*. Ed. Van den Bossche, H. pp. 117-125. Academic Press, New York.
- Van den Bossche, H. e De Nollin, S. (1973). Effects of mebendazole on the absorption of low molecular weight nutrients by *Ascaris suum*. *International Journal of Parasitology*, 3: 401-407.
- Van Wyk, J.A. (2001). Refugia – overlooked as perhaps the most potent factor concerning the development of anthelmintic resistance. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 68(1): 55-67.
- Veneziano, V., Di Loria, A., Masucci, R., Di Palo, R., Brianti, E., Gokbulut, C. (2011). Efficacy of eprinomectin pour-on against *Dictyocaulus arnfieldi* infection in donkeys (*Equus asinus*). *Veterinary Journal*, 190: 414-415.

- Veneziano, V., Galietti, A., Mariani, U., Di Loria, A., Piantedosi, D., Neola, B., Guccione, J., Gokbulut, G. (2013a). Field efficacy of eprinomectin against the sucking louse *Haematopinus asini* on naturally infested donkeys. *The Veterinary Journal*, 2013, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.02.020>.
- Veneziano, V., Gallo, A., Masucci, R., Benedetto, D., Neola, B., Pasolini, M.P., Gokbulut, C. (2013b). Clinical trial on the efficacy and safety of fenbendazole oral suspension (Panacur, 10%) on donkeys naturally infected by intestinal strongylidae. *In: XIX Congresso SIVE-FEEVA, 13 febbraio 2013 – Arezzo. Abstract Book*, pp. 353-354.
- Wood, E.L.D., Matthews, J.B., Stephenson, S., Slote, M., Nussey, D.H. (2013). Variation in fecal egg counts in horses managed for conservation purposes: individual egg shedding consistency, age effects and seasonal variation. *Parasitology*, 140: 115–128.
- Xiao, L., Herd, P.P., Majewski, G.A. (1994). Comparative efficacy of moxidectin and ivermectin against hypobiotic and encysted cyathostomes and other equine parasites. *Veterinary Parasitology*, 53: 83-90.

Capitolo 4

Antelmintico Resistenza e Strategie di Controllo

4.1 Introduzione

La resistenza è la capacità da parte di un parassita di sopravvivere a un trattamento antiparassitario che generalmente è efficace nei confronti della stessa specie ed allo stesso stadio d'infezione (Nielsen et al., 2013a).

Durante questo processo, i trattamenti antiparassitari rimuovono esclusivamente i parassiti sensibili al farmaco, portando così ad un aumento di quelli geneticamente resistenti. I trattamenti antiparassitari basati sulla strategia "*interval dose programme*" hanno comportato un rapido sviluppo di alleli resistenti nelle popolazioni di nematodi ed in particolar modo nei piccoli strongili degli equidi (CY) (Tzelos e Matthews, 2016).

Lo sviluppo della farmacoresistenza richiede quindi la presenza di geni per la resistenza ed è trasmissibile alle generazioni successive (figura 4.1)

La velocità alla quale l'antielmintico resistenza si sviluppa all'interno di una popolazione di parassiti è influenzata da differenti fattori quali: il numero di geni coinvolti, la biologia e l'epidemiologia del parassita, le relazioni che si instaurano tra il parassita e l'ospite, la frequenza dei trattamenti e la farmacocinetica delle molecole utilizzate (Churcher et al., 2010). I trattamenti antiparassitari effettuati secondo l'*interval dose programme* accelerano lo sviluppo della resistenza a causa della rimozione dei soli parassiti suscettibili ad una determinata molecola. Gli alleli resistenti quindi, nella popolazione parassita, predomineranno rispetto agli alleli suscettibili instaurando così il processo dell'antielmintico resistenza. Un animale parassitato da una popolazione di elminti resistenti trasmetterà, se non vengono rispettate le misure di quarantena corrette, i parassiti resistenti agli altri soggetti presenti in azienda (Tzelos e Matthew, 2016).

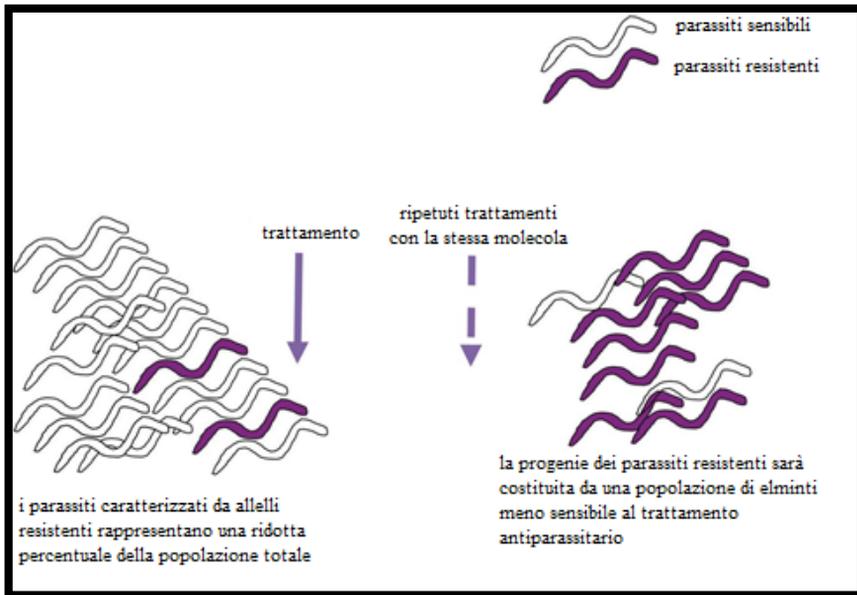


Fig. 4.1 Selezione per l'antelmintico resistenza nei nematodi (modificata da Tzelos e Matthews, 2016)

Una volta che la farmacoresistenza si è stabilita, la popolazione di parassiti resistenti nei confronti di una classe farmacologica non sembra poter diventare nuovamente suscettibile, per cui lo scopo del controllo dell'antelmintico resistenza è *in primis* prevenire lo sviluppo della resistenza stessa e successivamente evitare l'accumulo dei geni della resistenza (Sangster, 1999).

4.2 Test per la determinazione dell'antelmintico resistenza

La presenza dell'antelmintico resistenza (AR) all'interno di una azienda dev'essere diagnosticata il prima possibile per evitare l'insorgenza di sintomatologia clinica degli animali parassitati con elevate cariche, sia per sviluppare un programma di controllo delle elmintosi.

L'AR può essere valutata attraverso test *in vivo* e test *in vitro*.

4.2.1 Test *in vivo*

Il metodo più comunemente utilizzato per valutare l'efficacia dei trattamenti antiparassitari e quindi l'eventuale presenza di AR è il *Faecal Egg Count Reduction Test* (FECRT), tuttavia sono disponibili altri metodi *in vivo*, che consentono di determinare l'insorgenza di AR in una popolazione di parassiti. Questi test includono il *Controlled Test* ed il *Critical Test*.

4.2.1.1 Metodi di monitoraggio della FECs

Negli equidi la FEC *Faecal Egg Count* è una metodica diagnostica attraverso la quale è possibile stimare il numero degli elementi parassitari che sono escreti nelle feci, principalmente uova (UPG), anche se è possibile contare larve (LPG) ed oocisti (OPG) (Matthews, 2014).

L'utilizzo della *Faecal Egg Count* permette inoltre di:

- ✓ Valutare se, nei puledri e nei cavalli svezzati, le elmintiasi sono sostenute principalmente da *P. equorum* o da strongili intestinali (Nielsen et al., 2013a)
- ✓ Valutare l'efficacia delle molecole antiparassitarie espressa come percentuale di riduzione delle uova nelle feci in seguito ad un trattamento antiparassitario (*Faecal Egg Count Reduction Test* – FECRT) (Nielsen et al., 2013a)
- ✓ Valutare l'*Egg Reappearance Period* (ERP) delle molecole utilizzate per i trattamenti antiparassitari (Nielsen et al., 2013a)
- ✓ Venire a conoscenza della carica parassitaria di ogni singolo individuo e questo ritornerebbe utile nella gestione del pascolo. Valutare i livelli di escrezione dei nuovi soggetti che entrano in azienda e la possibilità di identificare gli animali da dover tenere in quarantena
- ✓ Ottenere benefici economici derivanti dall'utilizzo dei protocolli FEC rispetto ad effettuare trattamenti di tipo cadenzato/strategico (Lester et al., 2013b).

Esistono differenti test per l'esecuzione della FEC e questi differiscono tra loro in termini di sensibilità e della strumentazione necessaria per l'esecuzione del test stesso (tabella 4.1) (Matthews e Lester, 2015; Dias de Castro et al., 2017). Si raccomanda generalmente di utilizzare un

protocollo caratterizzato da una elevata sensibilità (cioè con un basso fattore di moltiplicazione), considerato che negli equidi, rispetto a quanto avviene nei ruminanti si osservano valori di FEC inferiori (Tzelos e Matthews, 2016).

Tab. 4.1 Differenti metodiche per la determinazione della FEC negli equidi

Metodica	Limite di sensibilità uova	Tempo dalla pesa ai risultati	Complessità	Passaggi necessari dalla pesa ai risultati
Centrifugazione/flottazione ¹	1 a 9*	Dai 10 ai 15 minuti	Complesso	7
FECPAK	20 UPG*	Dai 5 ai 10 minuti	Moderato	4
Mini-Flotac ²	5 UPG*	Dai 12 ai 15 minuti	Facile	5
McMaster ³	15-100 UPG*	5-10 minuti	Facile	4
Ovatec Plus	+ o -**	10 minuti	Facile	6

¹Bartley e Elsheikha, 2011; ²Barda et al., 2013; ³M.A.F.F., 1986

*Metodo quantitativo, fornisce il numero di uova per grammo di feci (UPG)

**Metodo qualitativo, fornisce la positività o negatività del campione

Il parametro più importante da dover considerare quando si sceglie la tecnica da utilizzare è il limite di sensibilità analitica del test. Il limite di sensibilità analitica è definito come il valore più basso, di *faecal egg count* positivo, che una determinata tecnica può riportare. Per esempio, una metodica con un limite di 25 UPG, non darà lo stesso risultato di una metodica con un limite di 1 UPG; ad esempio se il vero valore di UPG in un determinato campione è 17 la metodica con un limite di sensibilità pari a 25 darà come risultato “0”. La metodica maggiormente diffusa per la determinazione della FEC è stata sviluppata in Australia da Gordon e Whitlock (1939) e prevede l’utilizzo della camera McMaster, originariamente utilizzata per contare le uova dei parassiti delle pecore. Modifiche al protocollo originale (quantità di feci utilizzate ed il volume della soluzione flottante) suggeriscono che il fattore di moltiplicazione utilizzato può essere modificato quando si analizzano campioni di feci di bovini ed equidi; generalmente, i limiti di sensibilità utilizzati sono 5, 10, 20, 50 o 100 UPG (Roepstorff e Nanses, 1998; Noel et al., 2017). La tecnica McMaster, ad oggi, è riconosciuta dalla *World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology* (WAAVP) per valutare

Tab. 4.2 Soluzioni flottanti

	Soluzione flottante	Peso specifico
S1	Saccarosio (Sheather)	1.200
S2	Soluzione satura di Sodio Cloruro (NaCl)	1.200
S3	Zinco Solfato (ZnSO ₄ -7H ₂ O)	1.200
S4	Sodio Nitrato (NaNO ₃)	1.200
S5	Saccarosio e Potassio Iodomercurato (Rinaldi)	1.250
S6	Magnesio Solfato (MgSO ₄)	1.280
S7	Zinco Solfato (ZnSO ₄ -7H ₂ O)	1.350
S8	Potassio Iodomercurato	1.440
S9	Zinco Solfato e Potassio Iodomercurato (Tampieri-Restani)	1.450

Modificato da Manuale di parassitologia veterinaria (Genchi et al., 2014)

Nuove tecniche diagnostiche quali la FECPAK (Presland et al., 2005) ed il FLOTAC (Cringoli et al., 2010) rappresentano una evoluzione della metodica McMaster. Queste metodiche differiscono tra loro principalmente per la quantità di feci esaminate e per come le uova vengono isolate per la conta, alcune di queste prevedono una flottazione semplice (Gordon e Whitlock, 1939), altre prevedono l'utilizzo di una centrifuga (Cringoli et al., 2010).

La metodica FECPAK è essenzialmente una modifica della tecnica McMaster ed è stata sviluppata in Nuova Zelanda al fine di fornire un metodo semplice per la conta delle uova e decidere se effettuare o meno il trattamento antiparassitario (Bosco et al., 2014).

La tecnica FLOTAC è stata introdotta come alternativa alla tecnica McMaster. Il FLOTAC si compone di una base, un disco di traslazione e un disco di lettura (figura 4.3), a questi si aggiungo i componenti aggiuntivi (adattatore per centrifuga e per il microscopio, il fondo, la chiave e la vite).

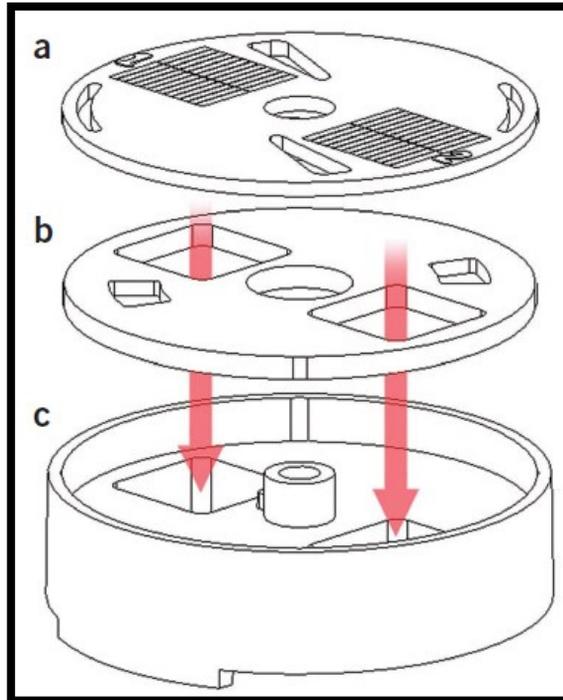


Fig. 4.3 Componenti dell'apparato FLOTAC, a) disco di lettura; b) disco di traslazione; c) base. Le frecce indicano le camere di flottazione. (modificato da Cringoli et al., 2010)

La base è caratterizzata dall'aver una forma circolare con due camere di flottazione, numerata rispettivamente con il numero 1 a sinistra, ed il numero 2 a destra. I numeri sono stampati in rilievo sul fondo di ognuna delle camere di flottazione. Le due camere hanno forma trapezoidale ovvero sono più strette sul fondo che non all'apertura; ciò per facilitare la flottazione degli elementi parassitari ed ognuna di esse ha una capacità di 5 ml. Sul bordo della base sono presenti quattro parole, ognuna contrassegnata da un diverso numero e da un differente colore e distanti tra loro di circa 90°.

La loro funzione è di indicare le fasi operative del FLOTAC:

FILLING (riempimento = n°1 - verde)

CLOSED (chiuso = n°2 - giallo)

READING (lettura = n°3 - rosso)

OPEN (aperto = n°4 - nero).

Le pareti della base sono state progettate in modo da accogliere con molta precisione i dischi di traslazione e di lettura. Il bordo, nella parte inferiore della Base, presenta due sporgenze necessarie per attaccare il FLOTAC all'Adattatore microscopio. Al centro della base è presente un foro, che permetterà il passaggio della vite in modo da sigillare tutte le componenti del FLOTAC dopo l'assemblaggio. Il disco di traslazione presenta al centro un foro per il passaggio della vite, e lateralmente due aperture di forma quadrata, che corrispondono esattamente alla porzione apicale delle due camere di flottazione. Sono inoltre presenti due piccole asole, le quali hanno la funzione di accogliere i due piccoli agganci presenti sulla faccia inferiore del Disco di lettura.

Il Disco di lettura presenta due reticoli di lettura dalla dimensione di 18 x 18 mm ed è diviso in 12 sezioni verticali parallele; inoltre due linee di maggiore spessore sono disposte a croce suddividendo ogni reticolo in 4 quadranti (figura 4.4). I due reticoli lettura sono contrassegnati con i numeri 1 e 2, stampati a rilievo sulla faccia superiore del disco.

In corrispondenza dei reticoli di lettura vi sono due aperture di forma triangolare, necessarie per il riempimento delle camere flottazione (asole di riempimento).

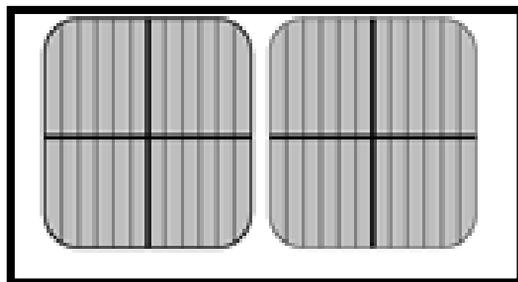


Fig. 4.4 FLOTAC: reticoli di lettura

Esistono due tipi di dischi di lettura: 100x e 400x (figura 4.5a,b) entrambi utilizzabili con le tecniche FLOTAC *basic*, *dual*, *double* e *pellet* (Cringoli et al., 2010).

Quando il FLOTAC è assemblato con il Disco lettura 100x è indicato come FLOTAC 100. Con questa configurazione le due camere di flottazione contengono ognuna un volume di 5 ml (volume totale = 10 ml). Quando il FLOTAC è assemblato con il Disco lettura 400x è indicato

come FLOTAC 400. Con questa configurazione le due camere flottazione contengono ognuna un volume di 5,5 ml (volume totale = 11 ml).

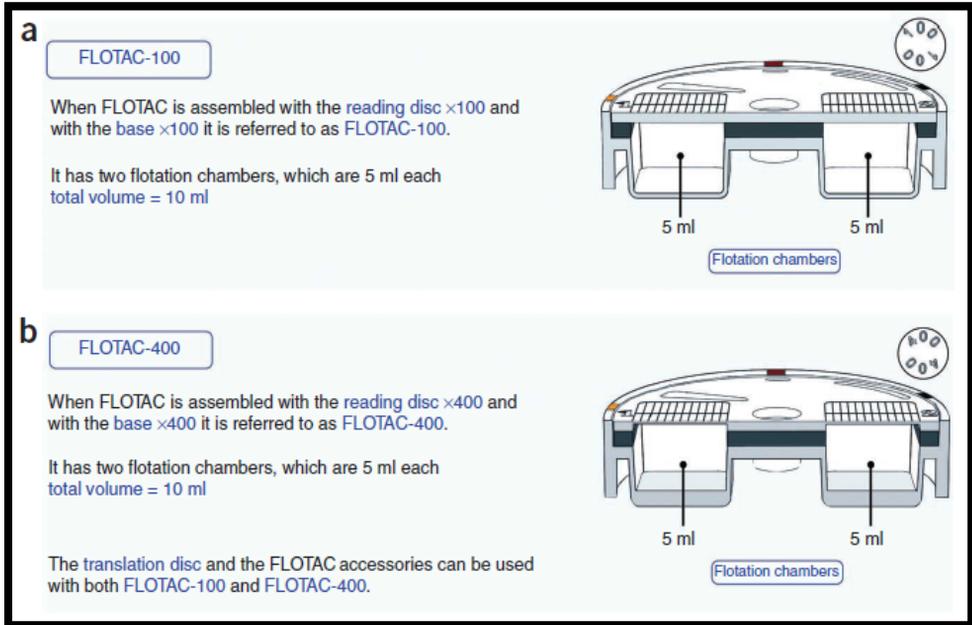


Fig. 4.5 Le due versioni dell'apparato FLOTAC.

- a) FLOTAC-100 adatto principalmente alla diagnosi di uova e larve di elminti
 b) FLOTAC-400 che può essere utilizzato per la diagnosi di protozoi intestinali
 (modificato da Cringoli et. al, 2010)

Sulla faccia inferiore del disco di lettura sono infine presenti due tasselli di traslazione (per il trascinamento del Disco traslazione) e al centro, una spirale realizzata per il meccanismo di apertura e per lo stop durante la traslazione dei dischi.

Per quanto riguarda gli accessori (figura 4.6), il fondo è stato progettato per assorbire le forze di deformazione dell'apparato durante la fase di centrifugazione. La *chiavetta* ha la funzione di bloccare i vari componenti del FLOTAC durante la centrifugazione; muove i dischi nelle varie fasi operative del FLOTAC e coadiuva l'apertura dell'apparato. Infine il *bullone* e la vite garantiscono la sicurezza del FLOTAC durante la centrifugazione, mentre l'*adattatore per centrifuga*, di forma rettangolare, con una depressione centrale per alloggiare il FLOTAC, consente la centrifugazione dell'apparato con i rotori per piastre microtiter. Inoltre, esso facilita l'utilizzo del FLOTAC, poiché porta stampati sulla faccia superiore i riferimenti per le fasi operative e raccoglie l'eventuale

materiale fuoriuscito durante le varie fasi di lavoro. L'*adattatore per il microscopio*, invece, accoglie gli alloggiamenti presenti sul bordo inferiore delle basi, consentendo la lettura del FLOTAC al microscopio.

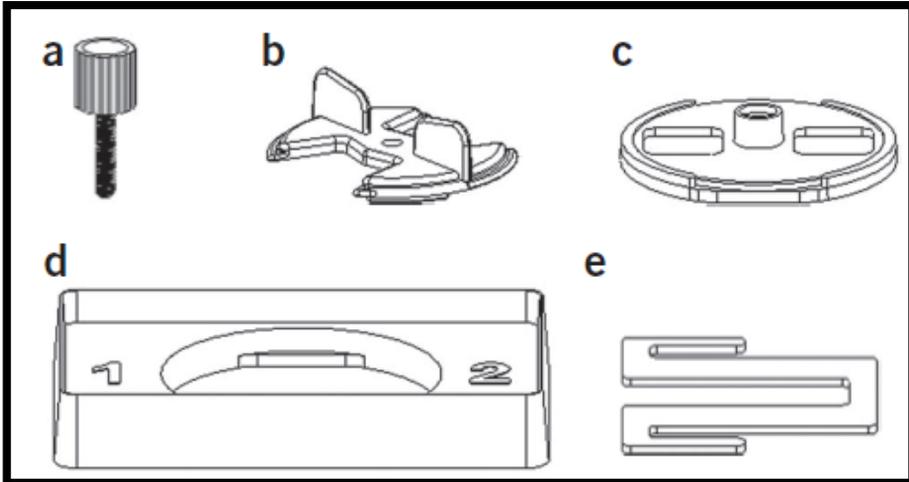


Fig. 4.6 Accessori dell'apparato FLOTAC. a) Bullone e vite; b) Chiave; c) Fondo; d) Adattatore per centrifuga; e) Adattatore per microscopio (modificato da Cringoli et al., 2010)

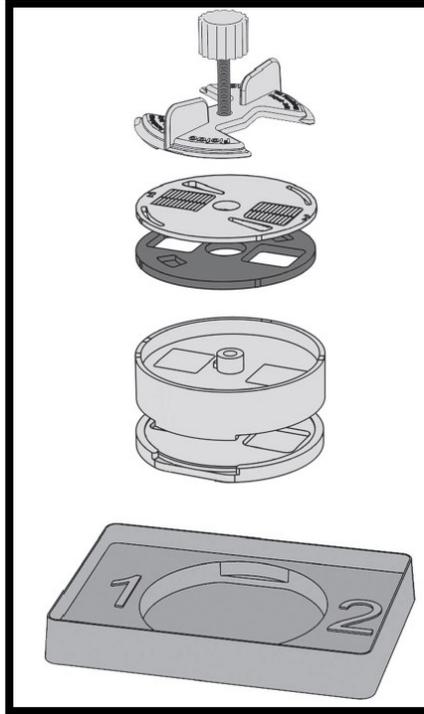


Fig. 4.7 Processo completo dell'assemblaggio del FLOTAC che mostra i componenti di base e gli accessori (modificato da Cringoli et al., 2010)

La FLOTAC *basic technique* prevede, durante l'esame del campione, l'utilizzo di una sola soluzione flottante, la più efficiente (gold standard) per l'elemento parassitario d'interesse. Questa tecnica è particolarmente indicata per la messa in evidenza e la conta di una sola specie parassitaria o quando i campioni di feci contengono elementi parassitari differenti che tuttavia flottano ugualmente con la soluzione flottante utilizzata. La sensibilità analitica di questa tecnica è di 1 UPG, 1 oocisti per grammo feci (OPG), 1 cisti per grammo feci (CPG), 1 larva per grammo feci (LPG). La FLOTAC *dual technique* prevede l'utilizzo di due soluzioni flottanti complementari (in termini di peso specifico e/o capacità flottante) utilizzate in parallelo sullo stesso campione. Questa tecnica è indicata per screening diagnostici con campioni contenenti elementi parassitari appartenenti a specie e o generi parassitari differenti; la sensibilità analitica di questa tecnica è di 2 UPG/LPG/OPG/CPG. La FLOTAC *double technique* prevede l'esame in parallelo di due campioni diversi, provenienti da due ospiti differenti, con uno stesso FLOTAC, destinando una camera

di flottazione a un campione e l'altra camera di flottazione all'altro campione, utilizzando una stessa soluzione flottante; la sensibilità analitica di questa tecnica è di 2 UPG/LPG/OPG/CPG. Le FLOTAC *pellet techniques* sono state sviluppate per campioni fissati, il cui peso all'interno del fissativo non è noto (situazione che avviene frequentemente nella routine diagnostica o in caso d'indagini epidemiologiche dove non sempre è possibile pesare il campione).

La tecnica FLOTAC consente la diagnosi simultanea di una vasta gamma di elminti e protozoi. Malgrado queste eccellenti caratteristiche diagnostiche, l'apparato FLOTAC è associato ad una diagnosi che richiede tempo e attrezzature di laboratorio specifiche che potrebbero ostacolare la sua vasta applicazione in Paesi con limitate risorse strumentali (Cringoli et al., 2017).

Proprio per questo motivo, recentemente è stata sviluppata una versione nuova di questa metodica denominata Mini-FLOTAC (Barda et al., 2013). Rispetto al FLOTAC, il Mini-FLOTAC è di più facile impiego, non richiedendo apparecchiature di laboratorio ad alta tecnologia, genera risultati estremamente riproducibili. Questa tecnica si basa sulla flottazione semplice degli elementi parassitari e si caratterizza dall'aver meno "step" rispetto alla tecnica FLOTAC da cui deriva. L'utilizzo del Mini-FLOTAC è associato al Fill-FLOTAC, un kit che protegge il personale di laboratorio, da eventuali rischi biologici, che potrebbero verificarsi nel corso della preparazione dei campioni fecali per la successiva osservazione al microscopio (raccolta, pesa, omogenizzazione, filtrazione e riempimento del dispositivo) (Cringoli et al., 2013).

Il Mini-Flotac è un apparato di forma cilindrica ed è stato progettato con un materiale policarbonato amorfo termoplastico. È costituito da 2 parti principali: la base e il disco di lettura a cui si aggiungono due accessori (la chiave e l'adattatore per il microscopio) (figura 4.8).

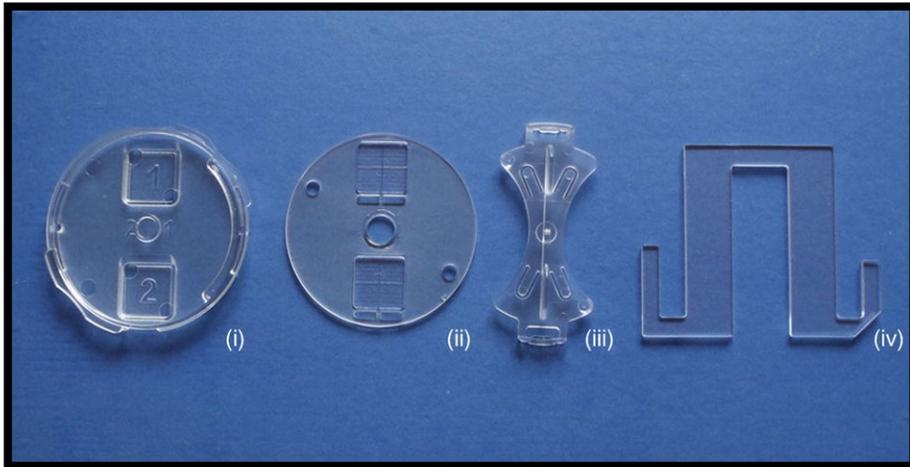


Fig. 4.8 Mini-FLOTAC componenti: (i) base; (ii) disco di lettura con due griglie; (iii) chiave; (iv) adattatore per microscopio (da Cringoli et al., 2017)

Il Mini-Flotac è caratterizzato dalla presenza di 2 camere di flottazione ognuna da 1 ml (volume totale 2 ml). Il Mini-Flotac permette un ingrandimento massimo di 400x necessario per la rilevazione delle oocisti e per il riconoscimento dei parassiti polmonari.

Il Fill-FLOTAC è un kit di un materiale termoplastico in policarbonato, composto da un contenitore graduato, un coperchio con due tappi a vite, da un collettore/omogenizzatore e da un filtro (figura 4.9). Esistono due versioni del Fill-FLOTAC:

- ✓ Fill-FLOTAC 2: che permette di analizzare fino a 2 gr di feci, utile per eseguire l'esame parassitologico di feci di cane, gatto ed uomo;
- ✓ Fill-FLOTAC 5: che permette di analizzare fino a 5 gr di feci, utile per eseguire l'esame parassitologico di feci degli animali da reddito.



Fig. 4.9 Fill-FLOTAC

(i) contenitore Fill-Flotac 2; (ii) coperchio Fill-FLOTAC 2 (con collettore/omogenizzatore e filtro); (iii) tappo a vite piccolo; (iv) tappo a vite grande; (v) puntale per riempire il Mini-FLOTAC; (vi) contenitore Fill-FLOTAC 5; (vii) coperchio Fill-FLOTAC 5 (con collettore/omogenizzatore e filtro); (viii) dispositivo per disassemblare il Fill-FLOTAC (da Cringoli et al., 2017)

La principale differenza tra il Mini-FLOTAC ed il FLOTAC consiste nella sensibilità diagnostica: la sensibilità del FLOTAC è di 1 UPG/LPG/OPG/CPG mentre la sensibilità del Mini-FLOTAC è di 5 UPG/LPG/OPG/CPG. Questa differente sensibilità analitica è dovuta ad un volume di sospensione fecale utilizzato nel Mini-FLOTAC di 5 volte

inferiore rispetto a quello utilizzato nel FLOTAC (2 ml di sospensione fecale utilizzati nel Mini-FLOTAC contro i 10 ml utilizzati nel FLOTAC).

Recentemente il Mini-FLOTAC è stato utilizzato nel cavallo dove Noel et al. (2017) hanno evidenziato come Mini-FLOTAC e McMaster hanno rispettivamente il 83,2% e il 53,7% di precisione. La accuratezza è stata del 42,6% per Mini-FLOTAC e McMaster e del 23,5%. Gli autori di questo studio riportano che il Mini-FLOTAC ha presentato una precisione ed accuratezza superiore al McMaster. Analogo risultato è stato riscontrato in uno studio condotto in 32 puledri purosangue naturalmente infettati da *cyathostominae* (>96%), selezionando 14 animali con FEC bassa (0-200 UPG), 14 con FEC media (205-400 UPG) e 14 con FEC alta (>400 UPG). Analizzando i risultati ottenuti gli autori hanno evidenziato che le medie dei tre gruppi, ottenuto tramite la tecnica McMaster e la tecnica Mini-FLOTAC, erano statisticamente differenti per il gruppo con FEC media. Pertanto, si raccomanda l'uso della tecnica Mini-FLOTAC, che è un metodo con meno variabilità e maggiore precisione, in particolare per gli animali con basse FEC (Dias de Castro et al., 2017).

4.2.1.2 Faecal Egg Count Reduction Test (FECRT)

Ad oggi il *Faecal Egg Count Reduction Test* (FECRT) è il metodo maggiormente utilizzato per valutare l'efficacia dei trattamenti antiparassitari. Questo test sembrerebbe tuttavia affidabile solo quando più del 25% dei nematodi presenti in una determinata popolazione sono resistenti al trattamento antiparassitario (Martin et al., 1989). Al fine di effettuare il FECRT un campione di feci deve essere prelevato il giorno del trattamento antiparassitario; dopo 14 giorni dal trattamento sarà prelevato un secondo campione di feci dallo stesso animale e attraverso la formula proposta di seguito si calcola la percentuale di riduzione per i soggetti testati:

$$FECRT = \frac{UPG(pre\ trattamento) - UPG(post\ trattamento)}{UPG(pre\ trattamento)} \times 100$$

La *AAEP Parasite Control Guidelines* ha suggerito dei valori di cut-off per interpretare i risultati della FECRT in base alle diverse classi farmacologiche come riportato di seguito (tabella 4.3).

Tab. 4.3 Valori suggeriti dalla *AAEP Parasite Control Guidelines* per l'interpretazione del FECRT negli strongili intestinali.

Classe farmacologica	Efficacia (in assenza di resistenza)	Risultati FECRT		
		Suscettibile (nessuna evidenza di resistenza)	Sospetta resistenza	Resistenza
Fenbendazolo /Oxibendazolo	99%	>95%	90-95%	<90%
Pyrantel	94-99%	>90%	85-90%	<85%
Ivermectina/ Moxidectina	99,9%	>98%	95-98%	<95%

Modificato da Nielsen et al. (2013a)

Un fallimento nel trattamento antiparassitario suggerirebbe la presenza di una popolazione di parassiti resistenti verso la molecola utilizzata.

Al fine di valutare l'antelmintico resistenza dovrebbero essere inclusi nello studio almeno sei animali in ogni azienda testata. Inoltre dovrebbero essere utilizzati quegli animali che presentano, alla FEC, il maggior valore di UPG. Gli animali non dovrebbero ricevere un trattamento antiparassitario nelle otto settimane antecedenti il FECRT (12 se viene utilizzata la MOX). Nell'interpretazione dei risultati ottenuti bisognerebbe tener conto che il FECRT potrebbe essere influenzato da diversi fattori riportati in tabella 4.4 (Vidyashankar et al., 2012).

Tab. 4.4 Fattori che influenzano il FECRT nel cavallo

Fattori	Outcome
Distribuzione non Gaussiana dei parassiti negli ospiti	Determina grande differenza dei valori pre trattamento tra gli animali appartenenti alla stessa azienda
Valori di FEC pre trattamento pari a 0 o molto bassi	Riduce i numeri di animali disponibili per la prova
Differenze circa la prevalenza delle infezioni parassitarie nelle diverse aziende	Determina grande differenza nei valori pre trattamento tra le diverse aziende
Variabilità ereditaria da parte dell'ospite di espellere le uova attraverso le feci	Determina la presenza di campioni non uniformi
Distribuzione non uniforme delle uova nella soluzione utilizzata per la FEC	Causa variabilità della FEC
Variazioni tecniche della performance della FEC	Causa variabilità della FEC
Stato di salute e condizione corporea dell'animale	Influenza la farmacocinetica e la farmacodinamica dei farmaci utilizzati per il trattamento
Differenze in età, razza e genere degli animali appartenenti sia alla stessa azienda sia ad aziende diverse	Aumento non specifico nella variabilità dei risultati
Differenze nel management ed alimentazione nelle diverse aziende	Aumento non specifico nella variabilità dei risultati; variazioni nella quantità e qualità di feci prodotte
Differenze geografiche dovute alla localizzazione delle aziende	Aumento non specifico nella variabilità dei risultati
Difficoltà nel determinare la quantità di farmaco assunto dagli animali	Alcuni animali potrebbero non ingerire tutta la quantità di farmaco somministrato
Le differenti specie di CY hanno siti di localizzazione diversi nell'ospite (cieco, colon dorsale, colon ventrale)	Differente esposizione dei parassiti al farmaco con conseguente differente efficacia specie-specifica
Diversità di specie di CY presenti può variare nelle varie aziende	L'efficacia specie-specifica potrebbe variare nelle diverse aziende
Diversità di specie di CY presenti può variare nei vari animali presenti in una stessa azienda	L'efficacia specie-specifica potrebbe variare da soggetto a soggetto
Effetti dipendenti dalla concentrazione dei parassiti e delle specie presenti	Il numero dei parassiti presenti e la proporzione delle differenti specie presenti negli ospiti potrebbero influenzare il numero delle uova prodotte
Differenze temporali dovute a prelievi di feci non uniformi nel tempo	Aumento non specifico nella variabilità dei risultati
Limitato numero di cavalli disponibili per il test	Aumenta l'impatto di tutte le altre fonti di variabilità e aumenta l'effetto che ogni singolo cavallo con una risposta scadente ha sulla classificazione di resistenza nella azienda

Modificato da Vidyashankar et al., 2012

Per queste ragioni bisognerebbe sempre ipotizzare che un ridotto valore d'efficacia potrebbe essere ascrivibile a fattori diversi e non necessariamente a AR.

4.2.1.3 *Controlled Test*

Questo metodo prevede almeno 6 animali parassitati per ogni gruppo (sarebbe meglio 10 animali); gli animali vengono assegnati *at random* al gruppo trattamento ed al gruppo controllo. Dopo circa 2 settimane dalla somministrazione del trattamento antiparassitario gli animali vengono sacrificati e sottoposti ad esame necroscopico al fine di contare i parassiti presenti. L'efficacia del farmaco è valutata confrontando il numero dei parassiti presenti negli animali trattati con il numero dei parassiti presenti negli animali non sottoposti al trattamento (Duncan et al., 2002). La percentuale di efficacia nei confronti di ogni singola specie di parassita presente viene calcolata attraverso la seguente formula:

$$eff. = \frac{\text{media parassiti controllo} - \text{media parassiti trattato}}{\text{media parassiti gruppo controllo}} \times 100$$

Sebbene rappresenti il metodo più affidabile per valutare l'efficacia antelmintica, è usato raramente in quanto ha costi elevati.

4.2.1.4 *Critical Test*

In questo metodo gli animali sottoposti a trattamento antiparassitario fungono da loro rispettivi controlli. Dopo la somministrazione del farmaco, le feci vengono raccolte quotidianamente da ciascun animale per la conta dei parassiti espulsi. Gli animali vengono poi sacrificati, generalmente dopo 7 giorni dal trattamento e l'efficacia viene calcolata in base al numero dei parassiti espulsi con le feci e i parassiti rinvenuti in corso di necroscopia (Duncan et al., 2002). L'efficacia viene calcolata secondo la seguente formula:

$$eff. = (n^{\circ} \text{ parassiti espulsi} + n^{\circ} \text{ parassiti alla necroscopia}) \times 100$$

Lo svantaggio di questo test è che i parassiti che generalmente si riscontrano a livello gastrico e intestinale quando passano attraverso le feci potrebbero essere parzialmente digeriti e quindi difficilmente riscontrati.

La sensibilità potrebbe essere inoltre ridotta in seguito alla quota di parassiti che si perdono, durante i 7 giorni della raccolta, quando gli animali defecano.

4.2.2 Test *in vitro*

I test *in vitro* sono stati inizialmente sviluppati per la valutazione dell'AR dei nematodi delle pecore (Coles et al., 2006). Le metodiche attualmente disponibili includono: *Egg Hatch Test*, *Larval Development Test* e *Micro Agar Larval Development Test*, *Larval Feeding Inhibition Assay*, *Larval migration inhibition test (LMIT)*.

4.2.2.1 Egg hatch test (EHT)

Tra i test da poter utilizzare *in vitro*, l'*Egg Hatch Test* è quello maggiormente utilizzato. L'EHT è stato inizialmente sviluppato per la valutazione dell'AR ai BZ, in quanto questa classe di farmaci antiparassitari impedisce lo sviluppo embrionale e la schiusa delle uova. La metodica originale è stata descritta da Le Jambre (1976) ed è stata utilizzata poi apportando delle modifiche da diversi autori (Taylor et al., 2002).

Il tiabendazolo rappresenta, grazie alla sua alta solubilità in acqua, la principale molecola utilizzata nell'esecuzione di questo test (Matthews et al., 2012). La sensibilità del test diminuisce con l'aumentare dell'età delle uova per cui dovrebbe essere eseguito al massimo entro tre ore dal prelievo; in alternativa le uova dovrebbero essere conservate in ambiente anaerobio (Hunt e Taylor, 1989). Questo metodo richiede, inoltre, la presenza di uova non embrionate, il che ne limita l'utilizzo nella pratica quotidiana; infatti le uova embrionate risultano essere meno sensibili ai BZ e questo potrebbe influenzare i risultati del test (Le Jambre, 1976). Nell'effettuare il test le uova sono incubate ad una concentrazione crescente di farmaco e, calcolando la percentuale di schiusa a ciascuna concentrazione, è possibile ottenere una curva dose-dipendente ed un valore di EC_{50} (concentrazione necessaria per evitare la schiusa del 50% delle uova). Nel cavallo alcuni studi hanno analizzato la resistenza dei CY attraverso questo test, confrontando il FECRT ed il valore di EC_{50} .

In alcuni casi hanno dimostrato delle correlazioni significative tra l'EHT ed il FECRT (Craven et al., 1999; Königová et al., 2003). Tuttavia le correlazioni ottenute non furono particolarmente esatte e non è stato

possibile determinare una concentrazione discriminante per la resistenza ai BZ con il EHT (Matthews et al., 2012).

4.2.2.2 Larval Development Test (LDT) e Micro Agar Larval Development Test (MALDT).

Questi due metodi si basano sull'inibizione dello sviluppo dell'elemento infettante (L3) in presenza di concentrazioni crescenti del farmaco da testare. A differenza dell'EHT, questi test hanno il vantaggio di poter testare, oltre ai BZ, anche le altre classi farmacologiche; le uova embrionate non rappresentano un limite nell'esecuzione del test e laddove fossero presenti più specie di parassiti le L3 possono essere identificate alla fine del test (Matthews et al., 2012). LDT è stato sviluppato in due versioni: una in fase liquida LDT (Hubert e Kerboeuf, 1992) ed una sul gel agar MALDT (Gill et al., 1995).

Questo test è stato per la prima volta utilizzato da Coles et al. (1988) che hanno incubato uova di nematodi utilizzando come nutrienti *E. coli*. Il test è stato efficace nel valutare l'AR nei confronti dei BZ, mentre Varady et al. (2009) hanno riportato difficoltà nella determinazione dell'AR per il levamisolo e l'IVM.

Taylor (1990) ha descritto una variante di questo test che prevede l'utilizzo, come fonte alimentare, estratti di lievito; questa variante è risultata efficace nel determinare la resistenza verso i BZ ed il levamisolo ma non verso l'IVM. Una variante di questo test è stata proposta da Hubert e Kerboeuf (1992) i quali hanno utilizzato estratti di lieviti per nutrire le larve, così facendo hanno potuto testare l'efficacia delle tre classi farmacologiche utilizzate nel trattamento delle parassitosi negli equidi.

Per ogni antiparassitario testato, viene calcolata la percentuale di sviluppo delle L3 a ciascuna concentrazione, successivamente viene determinata la dose-risposta ed il valore di CL50 (concentrazione in cui lo sviluppo del 50% delle L3 è inibito). Il LDT nel cavallo è stato testato attualmente sui piccoli strongili (Matthews et al., 2012).

4.2.2.3 Larval feeding inhibition test (LFIT)

Nella esecuzione del LFIT si valuta la capacità delle L1 di alimentarsi in presenza di concentrazioni crescenti di farmaci ad azione paralizzante quali le avermectine (Alvarez-Sánchez et al., 2005). Nell'esecuzione di questo test, *E. coli* liofilizzati vengono marcati con fluoresceina-

5isotiocinato; dopo essere state alimentate le L1 vengono osservate al microscopio al fine di identificare la fluorescenza a livello intestinale (Alvarez-Sánchez et al., 2005). Questo test è stato utilizzato per valutare la sensibilità antelmintica nei nematodi delle pecore tuttavia non sono disponibili studi sui CY negli equidi.

4.2.2.4 Larval migration inhibition test (LMIT)

Questo test valuta la capacità di migrazione delle L3 esposte a concentrazioni crescenti di farmaco (Boisvenue et al., 1983). Questo test è relativamente semplice da eseguire ed è particolarmente utile quando si esamina la resistenza di molecole ad azione paralizzante così come i LM. Nonostante numerose pubblicazioni che descrivono l'utilizzo di questo test, non è stato validato un protocollo per i CY nel cavallo (Matthews et al., 2012). Il protocollo maggiormente utilizzato prevede l'incubazione delle L3 a concentrazioni crescenti di farmaco prima di essere trasferiti in un altro apparato per ulteriori incubazioni. Questo apparato, generalmente costituito da un filtro che impedisce la retromigrazione, dev'essere abbastanza lungo al fine di garantire che tutte le larve siano sottoposte alla stessa migrazione. La percentuale di larve che migra è, infine, sottoposta a studi di sensibilità nei confronti del farmaco testato.

I test descritti *in vitro* sono stati validati e standardizzati principalmente per la valutazione della resistenza dei nematodi dei ruminanti.

Alcuni esperimenti sono stati eseguiti per il cavallo mentre non ci sono studi nell'asino. Nel settore equino, al momento nessuno, dei test *in vitro* descritti può essere considerato uno strumento affidabile o pratico alternativo alla FECRT (Matthews, 2014).

4.3 Egg Reappearance Period (ERP)

L'*Egg Reappearance Period* (ERP) è definito come l'intervallo di tempo che intercorre tra l'ultimo trattamento antiparassitario efficace e la ricomparsa delle uova degli strongili intestinali nelle feci. Negli Stati Uniti alcuni ricercatori suggeriscono la seguente definizione: la settimana post-trattamento durante la quale la riduzione percentuale di FEC scende al di sotto di un deterimanto cut-off (80% per i BZ e PYR ed 90% per i LM). Questo parametro è ottenuto eseguendo a cadenza settimanale il FECRT. Attualmente l'ERP varia a seconda delle classi farmacologiche dalle 4 alle

12 settimane. Nella tabella seguente (tabella 4.4) sono indicati i valori di ERP per le differenti classi farmacologiche.

Tab. 4.5 *Cyathostominae* egg reappearance period (ERP) per gli antelmintici per equini

Principio attivo	ERP in corso di efficacia	ERP quando il farmaco è stato introdotto la prima volta	ERP cut-off
BZ	4-5 settimane	6 settimane	80% ^a
PYR	4-5 settimane	5-6 settimane	80% ^b
IVM	6-8 settimane	9-13 settimane	90% ^c
MOX	10-12 settimane	16-22 settimane	90% ^d

^aMcBeath et al., (1978); ^bBoersema et al., (1995, 1996); ^cBorgsteede et al., 1993; Boersema et al., (1996); Demeulenaere et al., (1997); ^dJacobs et al., (1995); DiPietro et al., (1997); Demeulenaere et al., (1997).

Modificato da *AAEP Parasite Control Guidelines* (Nielsen et al., 2013a)

L'ERP ha poco valore se si è già instaurata una farmacoresistenza nei confronti di un principio attivo e la FECRT già evidenzia a due settimane l'inefficacia della molecola. La durata dell'ERP varia non solo in base alla scelta della molecola antelmintica ma anche in relazione alla dimensione del pascolo, all'età dei cavalli, al management aziendale e alle variazioni climatiche/stagionali. Una sua riduzione potrebbe essere indicativa dell'inizio di sviluppo di farmacoresistenza da parte del parassita nei confronti della molecola (Kaplan e Nielsen, 2010). Il monitoraggio del ERP ha una grande importanza e ricaduta pratica per la determinazione di casi di resistenza verso l'ivermectina e la moxidectina, molecole che si associano ad elevata riduzione delle uova nelle prime due settimane post trattamento (Nielsen et al., 2013a).

4.4 Strategie di controllo

A causa della diffusa AR nei confronti delle molecole disponibili in commercio per il trattamento delle elmintiasi negli equidi, bisognerebbe gestire la trasmissione dei parassiti riducendo il più possibile l'utilizzo dei farmaci antiparassitari.

L'obiettivo principale del controllo antiparassitario è rappresentato quindi dal limitare i livelli di trasmissione e di infezione dei parassiti evitando così lo sviluppo della malattia clinica.

A tal fine, i principali obiettivi da raggiungere sono:

- ✓ prevenire la trasmissione, attraverso i pascoli, degli stadi infettanti (specialmente nell'intervallo di tempo primavera-autunno)

- ✓ evitare l'accumulo dei parassiti in un soggetto promuovendo i giusti interventi terapeutici nel corso dell'anno
- ✓ assicurarsi che le molecole utilizzate siano realmente efficaci per lo scopo che si vuole raggiungere
- ✓ assicurarsi che sia somministrata la dose corretta di farmaco.

4.4.1 Refugia

Il termine *refugia* indica una subpopolazione di parassiti che non è esposta al farmaco durante un trattamento antiparassitario. Questa subpopolazione è costituita dagli stadi pre-infettanti (L1, L2 e L3) presenti nell'ambiente, dalla popolazione parassitaria presente nei soggetti non sottoposti al trattamento antiparassitario quando viene applicata una strategia di trattamento di tipo selettivo, dagli stadi parassitari all'interno dell'animale (es. larve incistate nella mucosa o nella sottomucosa) che, in seguito a fattori fisici, fisiologici o farmacocinetici, non sono sottoposti al trattamento antiparassitario. Le L3 e le L4 dei cyathostomi possono restare incistate per anni (Gibson, 1953) e solo alcune classi farmacologiche, a un dosaggio ben preciso, sono efficaci nei confronti di questi stadi. In assenza di trattamenti antiparassitari, questi stadi parassitari rappresentano, quindi, una quota di parassiti in *refugia* (Kaplan, 2002; Matthews, 2008).

Nella figura sottostante (figura 4.10) si riporta una rappresentazione schematica del concetto di *refugia*.

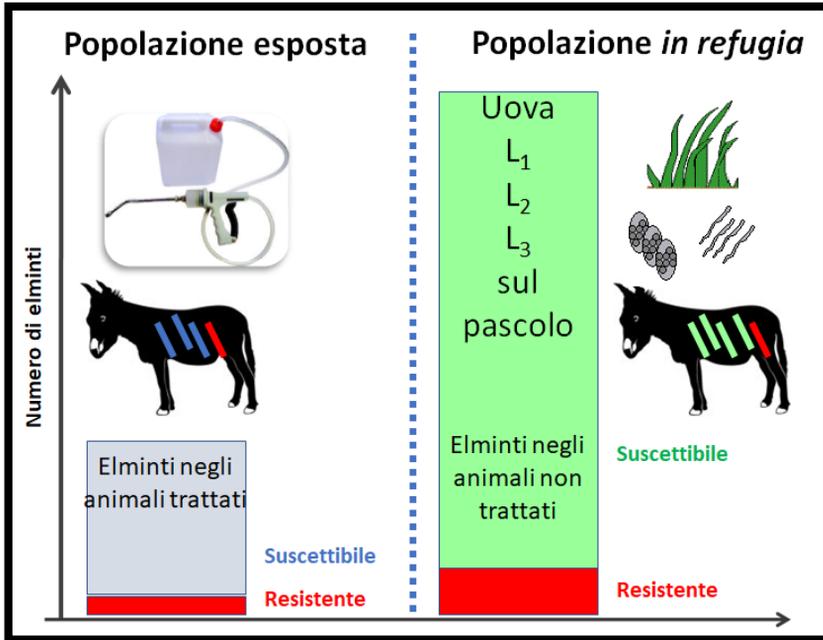


Fig. 4.10 Rappresentazione schematica del concetto di refugia nell'asino

I parassiti in *refugia* non sono selezionati per la resistenza e per questo motivo i parassiti resistenti saranno diluiti con quelli sensibili che rappresentano la maggioranza della popolazione (Leathwick et al., 2008; Waghorn et al., 2008). Questo potrebbe spiegare il motivo per cui la resistenza nei confronti dell'IVM possa aver impiegato più di 20 anni per svilupparsi nei cyathostomi (Kaplan, 2002; Matthews, 2008); infatti più è alta la proporzione dei parassiti in *refugia* più lentamente si svilupperà l'antelmintico resistenza. Il *refugia* assicura che ci sia sempre disponibile, sui pascoli, una popolazione di parassiti sensibili al trattamento. In tal modo, aumentando i parassiti in *refugia*, il tasso di resistenza nella popolazione elmintica si riduce. Sebbene il concetto del *refugia* possa apportare benefici nel controllo parassitologico negli equini (Nielsen et al., 2007; Matthews, 2008; Kaplan e Nielsen, 2010), a differenza di quanto avvenga nelle pecore (Martin et al., 1981; Waghorn et al. 2008; Leathwick et al., 2012) non sono stati effettuati studi di campo o modelli predittivi che confermino questa ipotesi. Il concetto del *refugia* può essere utilizzato al fine di ridurre al minimo la frequenza dei trattamenti antiparassitari quando il *refugia* sul pascolo è basso (ad esempio durante il periodo freddo invernale, torrido e caldo estivo o in periodi di siccità). Conseguentemente

il vecchio concetto del *dose-and-move* (tratta e sposta gli animali su un pascolo pulito), è, a oggi, considerato un fattore che favorisce lo sviluppo dell'antelmintico resistenza, in quanto spostare gli animali su un pascolo nuovo riduce l'effetto di diluizione che potrebbe invece essere garantito da un buon pascolo in *refugia* (Waghorn et al., 2009).

Il mantenimento in *refugia* di una popolazione di parassiti geneticamente sensibili ad una determinata classe farmacologica rappresenta uno dei fattori più importanti al fine di limitare lo sviluppo dell'antelmintico resistenza (van Wyk, 2001; Waghorn et al., 2008; Leathwick, 2012; Leathwick e Besier, 2014).

4.4.2 Stadi immaturi dei nematodi

A causa della patogenicità degli stadi larvali dei CY e di *S. vulgaris* sarebbe opportuno sviluppare test diagnostici al fine di evidenziare e quantizzare la presenza di queste larve. Recenti studi hanno identificato alcuni antigeni come marcatori diagnostici per la presenza degli stadi larvali dei CY (Dowdall et al., 2002, 2004; McWilliam et al., 2010) e di *S. vulgaris* (Andersen et al., 2013).

Test ELISA sono stati sviluppati nei confronti di un peptide, definito SvSXP, presente nella frazione escretoria/secretoria delle larve in migrazione di *S. vulgaris* (Andersen et al., 2013). Quando questo test è stato sviluppato il peptide è stato rinvenuto in una sequenza di cDNA sia delle L4 sia delle L5; tuttavia, non è ben chiaro quindi se questo gene sia espresso anche nelle fasi larvali precedenti (L3) e di conseguenza la sua presenza indica già uno stadio avanzato di infezione. Questa ipotesi potrebbe spiegare i risultati ottenuti nel corso di un ulteriore studio in cui i puledri infetti restavano sieronegativi per svariati mesi per poi diventare sieropositivi; nello specifico sembrerebbe che i puledri restino sieronegativi sino alle 12 settimane di vita (Nielsen et al., 2014). Inoltre, sempre nel corso del medesimo studio le analisi statistiche hanno dimostrato associazioni significative tra i valori di PP-ELISA e la presenza delle larve di *S. vulgaris* nell'arteria mesenterica craniale e questo è in accordo con quanto già affermato da Andersen et al. (2013).

4.4.3 Frequenza dei monitoraggio FEC

Bisognerebbe monitorare tutti gli animali, indipendentemente dall'età e dal genere, almeno una volta l'anno per valutare la presenza dei parassiti presenti e l'impatto che i protocolli di trattamento hanno sulla prevalenza delle differenti specie di parassiti. Un recente studio ha infatti dimostrato un aumento della prevalenza di *S. vulgaris* in seguito all'utilizzo dei trattamenti selettivi suggerendo che l'utilizzo delle differenti strategie di trattamento potrebbe a lungo andare influenzare la prevalenza delle specie parassitarie presenti in un'azienda (Nielsen et al., 2012).

4.4.4 Gestione del pascolo

Gli asini hanno esigenze nutrizionali e comportamentali completamente differenti rispetto ai cavalli. Gli asini, nei climi temperati, quando hanno libero accesso al pascolo corrono il rischio di diventare obesi e proprio per questo motivo, in genere, l'accesso al pascolo viene limitato per gran parte dell'anno. A tal fine i pascoli sono spesso delimitati attraverso delle recinzioni e sebbene questa pratica possa essere utile per il controllo del peso degli animali, il rischio di un'eccessiva contaminazione da parte dei parassiti è alto. Una buona gestione del pascolo dovrebbe garantire l'interruzione del ciclo biologico dei parassiti a ciclo diretto e diminuire così sia la carica parassitaria sia i livelli di infezione nell'ambiente. Proprio per questo motivo l'igiene del pascolo diventa di fondamentale importanza; infatti un buon management delle aree pascolative è da tempo riconosciuta come il metodo più efficiente per il controllo degli strongili intestinali degli equidi. Studi condotti al *The Donkey Sanctuary* hanno dimostrato che la rimozione delle feci dal pascolo, effettuata almeno due volte a settimana, ne permette di ridurre notevolmente la contaminazione (Matthews e Burden, 2013). È stato inoltre dimostrato che rimuovendo le feci dai pascoli almeno due volte a settimana si riduce la possibilità di sviluppo dell'elemento infettante (Corbett et al. 2014). Inoltre, alternando o condividendo il pascolo con i ruminanti si riduce la possibilità di infezione in quanto si ha un effetto di diluizione tra le diverse specie animali (Matthews e Burden, 2013; Tzelos e Matthews, 2016). È stato dimostrato che le pecore dovrebbero pascolare su un terreno precedentemente impiegato per gli asini dopo un periodo di riposo e che il pascolamento di specie animali diverse dovrebbe essere garantito almeno

per 6 mesi al fine di ridurre la contaminazione da parte dei parassiti (Kuzmina et al., 2006).

Infine far riposare i pascoli nei periodi in cui la probabilità di mortalità delle larve dei nematodi è maggiore risulterebbe essere vantaggioso per il controllo delle parassitosi in quanto diminuirebbe il livello di contaminazione dei pascoli stessi (Tzelos e Matthews, 2016).

4.4.5 Quarantena

I nuovi animali che entrano in azienda dovrebbero essere sottoposti a trattamento antiparassitario con MOX+PZQ e mantenuti lontano dai pascoli per almeno 3 giorni, in quanto è stata osservata una massiva espulsione di uova in cavalli che erano stati sottoposti a trattamento antiparassitario entro 3-4 giorni (de Lima Saes et al., 2016).

4.4.6 Utilizzo di funghi nematofagi

Negli ultimi anni sono stati introdotti metodi di controllo biologico caratterizzati dall'utilizzo di funghi ad azione parassitocida. È stato infatti dimostrato che l'utilizzo di funghi quali *Duddingtonia flagrans* e *Monacrosporium thaumassium* riduce lo sviluppo degli stadi larvali degli strongili nei ruminanti (Araújo et al. 2004). Studi *in vitro* hanno dimostrato l'efficacia da parte di *Mucor circinelloides* nella distruzione delle uova di *Fasciola hepatica* e *Parascaris equorum* rilasciate attraverso le feci degli animali parassitati (Arroyo et al. 2016).

Sono limitati gli studi in campo che hanno applicato negli equidi questo metodo di controllo biologico; Hernández et al. (2016) hanno valutato la capacità parassitocida di due specie fungine *Mucor circinelloides* (ovicida) e *Duddingtonia flagrans* (larvicida), in seguito ad inoculazione delle spore nei mangimi pellettati. Nel corso della prova 21 ponies della Galizia sono stati assegnati *at random* a tre gruppi di studio: il gruppo G-P, sottoposto a trattamento antiparassitario nel mese di agosto con IVM pour on al dosaggio di 1 mg/kg P.V., alimentato quotidianamente con pellets contenenti spore fungine; il gruppo G-T, sottoposto a trattamento antiparassitario nel mese di agosto con IVM pour-on al dosaggio di 1 mg/kg P.V., alimentato con pellets senza spore fungine; ed il gruppo G-C non sottoposto a trattamento antiparassitario ed alimentato con pellets senza spore fungine. Le feci di questi ponies sono state prelevate con frequenza mensile direttamente dall'ampolla rettale ed analizzate

attraverso FEC (sensibilità analitica 30 UPG). Per ogni gruppo sono state inoltre effettuate coproculture al fine di permettere lo sviluppo della L3 per identificare le specie di strongili intestinali presenti. L'efficacia parassiticida delle spore fungine è stata stiamata sia in termini di riduzione delle uova nelle feci (FECRT) sia valutando il numero di ponies che eliminava uova attraverso le feci (PHR) (Francisco et al., 2012).

Prima dell'inizio della prova la percentuale di ponies che eliminava uova di *P. equorum* variava dal 14% (1/7 nel gruppo G-T) al 29% (2/7 nei gruppi G-C e G-P); tutti i ponies eliminavano uova di strongili intestinali con un valore di UPG>500. In seguito alla somministrazione pour-on di IVM in entrambi i gruppi di trattamento si è avuto una riduzione della FECR e del PHR pari al 100%. I ponies appartenenti al gruppo G-T hanno presentato un significativo incremento nell'espulsione delle uova dall'ottava settimana post-trattamento raggiungendo valori simili a quelli del gruppo G-C oscillando tra le 310 UPG (ventesima settimana post trattamento) e le 773 UPG (quarantaquattresima settimana post trattamento) mentre i ponies appartenenti al gruppo G-P hanno presentato una FEC che oscillava in un range di 44 e 247 UPG rispettivamente tra l'ottava e la sessantesima settimana post trattamento. Gli autori hanno dimostrato che l'utilizzo delle spore fungine all'interno dei mangimi può ridurre il rischio delle infezioni parassitarie sostenute sia da *P. equorum* sia da strongili intestinali. Araujo et al. (2012), negli asini, hanno valutato l'efficacia da parte di *D. flagrans* e *M. thaumasium*, in seguito all'ingestione delle L3 di *S. westeri*. A tale scopo sono state utilizzate 12 asine che, 14 giorni prima dell'inizio dello studio, erano state trattate con 1% IVM al dosaggio di 200 µg/kg P.V. e PYR pamoato al dosaggio di 6,6 mg/kg P.V. Gli asini sono stati suddivisi in 3 gruppi: al primo gruppo sono stati somministrati, in un'unica somministrazione, 100 gr di pellets contenenti spore fungine di *D. flagrans*; al secondo gruppo sono stati somministrati, sempre in un'unica somministrazione, 100 gr di pellets contenenti spore fungine di *M. thaumasium* mentre il terzo gruppo ha ricevuto 100 gr di pellets senza aggiunta di spore fungine. I campioni di feci, da ogni gruppo di studio, sono stati raccolti a 12, 24, 48 e 72 ore. È stato osservato che i funghi *D. flagrans* e *M. thaumasium* sono in grado di uccidere le L3 di *S. westeri*.

4.5 L'antelmintico resistenza nel cavallo

Nel cavallo, popolazioni di CY resistenti ai trattamenti con benzimidazolici e tetraidropirimidine, sono state ampiamente riportate a livello mondiale (Kaplan et al., 2004; Traversa et al., 2009; 2012); infatti, nel complesso, la resistenza ai BZ ed al PYR è stata riportata rispettivamente in 14 e in 12 Paesi (Peregrine et al., 2014).

La resistenza verso i BZ era già stata descritta negli anni '60 da Drudge e Lyons (1965); inoltre recenti studi condotti in diverse aziende equine hanno dimostrato resistenza verso i BZ (Traversa et al., 2007, 2009, 2012; Milillo et al., 2009; Rossano et al., 2010; Canever et al., 2013; Garcia et al., 2013; Geurden et al., 2013; Lester et al., 2013a; Kumar e Vatsya, 2014; Stratford et al., 2014; Cernea et al., 2015; Smith et al., 2015; Kumar et al., 2016; Alanazi et al., 2017). A causa dell'elevata diffusione di antelmintico resistenza verso il FBZ, questa molecola non dovrebbe essere utilizzata nelle aree in cui sono stati riportati fenomeni di ridotta efficacia (Relf et al., 2014; Stratford et al., 2014).

La resistenza al PYR è stata documentata a partire dagli anni '90 (Chapman et al., 1996) e ad oggi risulta abbastanza diffusa (Traversa et al., 2007, 2009, 2012; Näreaho et al., 2011; Canever et al., 2013; Nielsen et al., 2013b; Stratford et al., 2014; Fisher et al., 2015; Smith et al., 2015).

La resistenza ai lattoni macrociclici sembra essere in aumento verso i piccoli strongili e finora è stata osservata principalmente come una riduzione della ERP dopo il trattamento (Tzelos e Matthews, 2016).

Sangster (1999) ha suggerito per primo che una riduzione dell'ERP è il primo indicatore dello sviluppo di antelmintico resistenza.

Questa tesi è supportata da studi recenti in cui è stato riportato un ridotto ERP in seguito a trattamento antiparassitario con IVM e MOX e sopravvivenza delle L4 nel lume intestinale di giovani cavalli (Lyons et al., 2009, 2010).

Daniels e Proudman (2016) hanno riportato un ridotto valore di ERP in seguito a trattamento con IVM e MOX, essendo rispettivamente di 5 e 11-13 settimane. Questi risultati sono in linea con quelli riportati da Relf et al. (2014) che evidenziano una riduzione dell'ERP dopo 4-9 settimane.

Gli studi sulla riduzione dell'ERP dei LM sono riassunti nella tabella che segue (tabella 4.6)

Tab. 4.6 Reports di riduzione del Egg Reappearance Period in CY dopo trattamento con LM nel cavallo

Bibliografia	Paese	IVM	MOX
Von Samson-Himmelstjerna et al. (2007)	Germania	35 gg	
Rossano et al. (2010)	USA		35 gg
Lyons et al. (2011)	USA	28 gg	35 gg
Van Doorn et al. (2014)	Paesi Bassi	28 gg	42 gg
Geurden et al. (2014)	Belgio, Italia, Paesi Bassi	28 gg	42 gg
Relf et al. (2014)	UK		28 gg
Daniels e Proudman (2016)	UK	35 gg	
Tzelos et al. (dati non pubblicati)	UK		42 gg
Bellaw et al., 2017	USA		35gg

Modificato da Tzelos e Matthews, 2017

Un limitato numero di studi hanno descritto la popolazioni di CY che sono risultati resistenti all'IVM valutata con il FECRT in Italia ed UK (Traversa et al., 2009). Molento et al. (2008) hanno riportato, in Brasile, una ridotta efficacia da parte dell'IVM e della MOX nel controllo dei cyathostomi a partire dal 28° giorno post trattamento.

Oltre che nei CY, resistenza ai LM, è stata riportata, a livello mondiale anche verso *P. equorum* (tabella 4.7) (Boersema et al., 2002; Hearn e Peregrine, 2003; Craig et al., 2007; von Samson-Himmelstjerna et al., 2007; Schougaard e Nielsen, 2007; Slocombe et al., 2007; Lindgren et al., 2008; Lyons et al., 2008b; Lind e Christensson, 2009; Veronesi et al., 2009, 2010; Näreaho et al., 2011; Laugier et al., 2012; Geurden et al., 2013; Armstrong et al., 2014; Beasley et al., 2015).

Tab. 4.7 Reports di resistenza ai LM di *Parascaris spp.* nel cavallo

Bibliografia	Paese	Efficacia (%)	
		IVM	MOX
Hearn e Peregrine (2003)	Canada	< 95	
Craig et al. (2007)	USA	< 75	
Slocombe et al. (2007)	Canada	<33,5	47,2
Schougaard e Nielsen, 2007	Danimarca	52-100	
Von Samson-Himmelstjerna et al. (2007)	Germania	<95	
Lyons et al. (2008)	USA	0	
Lind e Christenson (2009)	Svezia	0-100	
Veronesi et al. (2009)	Italia	63	
Veronesi et al. (2010)	Italia	58-84 72-81	69-83 81-86
Näreaho et al. (2011)	Finlandia	52	
Laugier et al. (2012)	Francia	30-8,9	
Geurden et al. (2013)	Francia	45,5	
Armstrong et al. (2014)	Australia	46,2-99,2	
Beasley et al. (2015)	Australia	46,6-84,3	
Lassen e Peltola (2015)	Estonia	89%	

Modificato da Tzelos e Matthews, 2017

Inoltre, uno studio condotto in Kentucky ha riportato una ridotta efficacia del PYR verso *P. equorum* (Lyons et al., 2008b), dimostrando così la possibilità da parte di questo parassita di sviluppare resistenza anche nei confronti di altre classi farmacologiche; infatti, studi recenti hanno riportato fenomeni di resistenza da parte di *P. equorum* sia nei confronti dei sali di PYR sia dei BZ (Armstrong et al., 2014, Peregrine et al., 2014).

4.6 L'antelmintico resistenza nell'asino

Negli asini, a differenza di quanto avviene nei cavalli, l'antelmintico resistenza è un fenomeno ancora poca diffuso; probabilmente grazie alla minore frequenza di trattamenti e quindi alla minore pressione a livello genetico. Sebbene il primo report di sospetta resistenza al mondo della moxidectina verso i cyathostomi è stato riportato proprio negli asini del *Donkey Sanctuary* nel Dorset, in Inghilterra.

Sono state eseguite due prove cliniche di campo con una formulazione di MOX registrata per l'utilizzo iniettabile nel bovino e somministrata agli asini per via orale.

Nel primo trial sono stati trattati 600 asini dopo la stagione di pascolo e si è riscontrato una netta riduzione dell'ERP a 8 settimane contro le 10-12

settimane normalmente attese. Nel secondo trial il FECR Test è stato eseguito su due gruppi di asini con valutazione del FEC post trattamento a 25 e 14 giorni. A seguito del trattamento con MOX off-label per via orale i valori di riduzione della FEC furono solo del 31% nel gruppo testato a 25 giorni e del 87% nel gruppo testato a 14 giorni dal trattamento. Gli Autori di queste ricerche hanno indicato che una riduzione della efficacia associata ad un ERP più breve poteva essere verosimilmente attribuibile ad una resistenza della MOX verso la popolazione di cyathostomi presente al Donkey Sanctuary in Inghilterra. Tuttavia gli stessi Autori hanno ipotizzato che l'utilizzo extra-label della molecola poteva aver influenzato la farmacocinetica e giustificava parzialmente il fallimento del trattamento. In aggiunta, la farmacocinetica della moxidectina nell'asino non è ancora stata indagata e resta il dubbio se il dosaggio nell'asino della moxidectina possa essere direttamente estrapolato dal dosaggio del cavallo Trawford et al. (2005).

Questa riduzione dell'ERP della MOX sono stati successivamente confermati da uno studio condotto presso il "Rifugio degli Asinelli" (Pacifico, 2014). In questa prova clinica di campo, 29 asini (17 maschi e 12 femmine) con età media di 10 anni (range 4 - 21 anni), positivi ai CY sono stati sottoposti a trattamento antiparassitario con MOX gel orale al fine di valutare sia l'efficacia farmacologica attraverso il FECRT sia l'ERP. A 14 giorni dal trattamento la FECR era pari al 99,7%. A 28 giorni dal trattamento antiparassitario, 2 asini hanno presentato un valore medio di FEC pari a 30 UPG mentre al 56° giorno post trattamento 7 asini hanno presentato una positività agli SI con un valore di UPG che oscillava tra 10 e 110. Ad 84 giorni, ventitrè asini hanno eliminato uova di SI con un valore medio di 147 UPG. Le coproculture effettuate dopo il trattamento antiparassitario hanno evidenziato esclusivamente la presenza di cyathostomi. Lo studio ha quindi evidenziato, nell'asino, un ridotto ERP della MOX.

Binev et al. (2005) hanno valutato l'utilizzo dell'IVM iniettabile (10 mg di IVM per 1 ml di soluzione) per il controllo delle strongilosi nell'asino. Nello studio sono stati inclusi 263 asini (152 femmine e 111 maschi) che sono stati trattati ad una posologia di 0,2 mg/kg PV. In seguito al trattamento antiparassitario il FECRT ha riportato una riduzione del 96%. Inoltre il 92,2% degli animali ha riportato completa riduzione delle uova (UPG=0) mentre il 7,8% degli asini ha evidenziato una FECR del 72%. Nessun animale ha sviluppato lesioni a livello del sito di inoculo. Secondo

gli autori l'utilizzo dell'IVM per via sottocutanea risulta efficace nel controllo della strongilosi nell'asino.

Fangama et al. (2013) hanno valutato l'efficacia dell'IVM e della MOX in asini allevati in Sudan. Nello specifico hanno suddiviso 24 asini di sesso maschile, con un range di età che variava dai 4 ad i 10 anni, in 4 gruppi. Il primo gruppo è stato trattato con IVM per via sottocutanea al dosaggio di 200 µg/kg P.V.; il secondo gruppo è stato trattato con MOX per via sottocutanea al dosaggio di 0,2 mg/kg P.V.; il terzo gruppo è stato trattato con MOX per via intramuscolare sempre al dosaggio di 0,2 mg/kg P.V.; mentre il quarto gruppo non è stato sottoposto a trattamento antiparassitario. Gli esami parassitologici sono stati effettuati per tutti i gruppi nei giorni 0 (giorno del trattamento) e successivamente nei giorni +1, +3, +7 e +14. L'efficacia antiparassitaria delle molecole testate, valutata a 14 giorni dal trattamento, è stata del 100%, del 90,9% e del 78,5% rispettivamente per l'IVM somministrata per via sottocutanea, per la MOX somministrata per via sottocutanea e per la MOX somministrata per via intramuscolare. Anche per questo lavoro la resistenza della MOX iniettabile potrebbe essere associata ad una dose subterapeutica piuttosto che alla presenza di AR.

Lawson et al. (2015) hanno valutato l'efficacia del PYR in due aziende (A e B) asinine in Inghilterra. Questi autori in entrambe le aziende, in seguito ad esami copromicroscopici effettuati tramite la metodica McMaster, hanno sottoposto a trattamento antiparassitario *per os* gli asini con una FEC > 1000 UPG. Nell'azienda (A) sono stati sottoposti a trattamento antiparassitario 32 asini (12 femmine e 20 maschi) ed in seguito al trattamento antiparassitario la percentuale media di riduzione ottenuta tramite il FECRT è stata del 72% (95% CI [53, 83]). Sei asini (19%) hanno presentato una FECR ≥ 95%; 12 asini (38%) hanno presentato una FECR ≥ 90% mentre 14 (44%) hanno presentato una FECR ≥ 80%. Nell'azienda (B), sono stati sottoposti a trattamento antiparassitario 22 asini (11 femmine ed 11 maschi). In questa azienda, la percentuale media di riduzione è stata del 70%. Nello specifico 6 di 22 asini (27%) hanno presentato una FECR ≥ 95%; 8 (36%) hanno presentato una FECR ≥ 90% mentre 13 (59%) hanno presentato una FECR ≥ 80%. Questo studio ha quindi evidenziato, in entrambe le aziende la presenza di popolazioni di cyathostomi resistenti al PYR. Infatti la percentuale media di riduzione è stata inferiore al 90%.

Sempre nell'asino sono stati inoltre riportati casi di antielmintico resistenza da parte di *P. equorum* nei confronti del PYR embonato, dell'IVM e della MOX (Matthews e Burden, 2013).

Così come avviene nel cavallo, anche nell'asino, il controllo sia degli stadi larvali sia degli stadi adulti di *O. equi* si attua mediante l'utilizzo del FBZ, dell'IVM e della MOX mentre il PYR risulta essere efficace esclusivamente verso gli stadi adulti. Sebbene nel cavallo sia stata riportata una ridotta efficacia dei LM nel controllo delle parassitosi sostenute da *O. equi* (Schankova et al., 2013; Wolf et al., 2014; Felippelli et al., 2015), nell'asino questo fenomeno non è stato ancora descritto. Tuttavia, alcuni autori hanno riscontrato una probabile ridotta efficacia da parte dell'IVM e del PYR (Matthews e Burden, 2013).

Bibliografía

- Alanazi, A.D., Murkbel, R.M., Alyousif, M.S., AlShehri, Z.S., Alanazi, I.O., Al-Mohammed, H.I. (2017). A field study on the anthelmintic resistance of *Parascaris* spp. in foals in the Riyadh region, Saudi Arabia. *The Veterinary Quarterly*, 37(1): 200-205.
- Alvarez-Sánchez, M.A., Pérez Garcia, J., Bartley, D., Jackson, F., Rojo-Vázquez, F.A. (2005). The larval feeding inhibition assay for the diagnosis of nematode anthelmintic resistance. *Experimental Parasitology*, 110: 56-61.
- Andersen, U.V., Howe, D.K., Dangoudoubyam, S., Toft, N., Reinemeyer, C.R., Lyons, E.T., Olsen, S.N., Monrad, J., Nejsun, P., Nielsen, M.K., (2013). SvSXP: a *Strongylus vulgaris* antigen with potential for prepatent diagnosis. *Parasites & Vectors*, 6: 84.
- Araújo, J.V., Guimarães, M.P., Campos, A.K., Sá, N.C., Sarti, P., Assis, R.C.L. (2004). Control of bovine gastrointestinal nematode parasites using pellets of the nematode-trapping fungus *Monacrosporium thaumasium*. *Ciência Rural Santa Maria-RS*, 34: 457-463.
- Araujo, J.M., Araújo, J.V., Braga, F.R., Tavela Ade, O., Ferreira, S.R., Soares, F.E., Carvalho, G.R. (2012). Control of *Strongyloides westeri* by nematophagous fungi after passage through the gastrointestinal tract of donkeys. *Revista brasileira de parasitologia veterinaria*, 21(2): 157-60.
- Armstrong, S.K., Woodgate, R.G., Gough, S., Heller, J., Sangster, N.C., Hughes, K.J. (2014). The efficacy of ivermectin, pyrantel and febendazole against *Parascaris equorum* infection in foals on farm in Australia. *Veterinary Parasitology*, 2015: 575-580.
- Arroyo, F.L., Arias, M.S., Cazapal-Monteiro, C.F., Hernández, J.A., Suárez, J., Miguélez, S., Romasanta, A., Sánchez-Andrade, R., Paz-Silva, A. (2016). The capability of the fungus *Mucor circinelloides* to maintain parasitocidal activity after the industrial feed pelleting enhances the possibilities of biological control of livestock parasites. *Biological Control*, 92: 38-44.
- Barda, B.D., Rinaldi, L., Ianniello, D., Zepherine, H., Salvo, F., Sadutshang, T., Cringoli, G., Clementi, M., Albonico, M. (2013). Mini-FLOTAC, an innovative direct diagnostic technique for intestinal parasitic infections: experience from the field. *PLoS Neglected Tropical Disease*, 7, e2344.
- Bartley, D.J. e Elsheikha, H.M. (2011). Laboratory diagnosis of parasitic infections. In: *Essentials of Veterinary Parasitology*. Eds. Elsheikha, H.M. e Khan, N.A. Caister Academic Press. pp. 143-148.
- Beasley, A., Coleman, G., Kotze, A.C. (2015). Suspected ivermectin resistance in a south-east Queensland *Parascaris equorum* population. *Australian Veterinary Journal*, 93(9): 305-307.
- Bellaw, J.L., Krebs, K., Reinemeyer, C.R., Norris, J.K., Scare, J.A., Pagano, S., Nielsen, M.K. (2017). Anthelmintic therapy of equine cyathostomin nematodes – larvicidal efficacy, egg reappearance period, drug resistance. *International Journal for Parasitology*, doi: 10.1016/j.ijpara.2017.08.009.
- Binev, R., Kirkova, Z., Nikolov, J., Russenov, A., Stojanchev, K., Lazarov, L., Hristov, T. (2005). Efficacy of parenteral administration of ivermectin in the control of

- strongylidosis in donkeys. *Journal of the South Africa Veterinary Association*, 76(4): 214-216.
- Boersema, J.H., Borgsteede, F.H.M., Eysker, M., Saedt, I. (1995). The reappearance of strongyle eggs in feces of horses treated with pyrantel embonate. *Veterinary Quarterly*, 17: 18-20.
- Boersema, J.H., Eysker, M., Maas, J., van der Aar, W.M. (1996). Comparison of the reappearance of strongyle eggs in foals, yearlings, and adult horses after treatment with ivermectin or pyrantel. *Veterinary Quarterly*, 18: 7-9.
- Boersema, J.H., Eysker, M., Nas, J.W.M. (2002). Apparent resistance of *Parascaris equorum* to macrocyclic lactones. *Veterinary Record* 150, 279–281.
- Boisvenue, R.J., Brandt, M.C., Galloway, R.B., Hendrix, J.C. (1983). In vitro activity of various anthelmintic compounds against *Haemonchus contortus* larvae. *Veterinary Parasitology*, 13: 341-347.
- Borgsteede, F.H.M., Boersma, J.H., Gaasenbeek, C.P.H., Vanderburg, W.P.J. (1993). The reappearance of eggs in feces of horses after treatment with ivermectin. *Veterinary Quarterly*, 15: 24-26.
- Bosco, A., Rinaldi, L., Maurelli, M.P., Musella, V., Coles, G.C., Cringoli, G. (2014). The comparison of FLOTAC, FECPAK and McMaster techniques for nematode egg counts in cattle. *Acta Parasitologica*, 59(4): 625-628.
- Canever, R.J., Braga, P.R.C., Boeck, A., Grycajuck, M., Bier, D., Molento, M.B. (2013). Lack of Cyathostomin sp. reduction after anthelmintic treatment in horses in Brazil. *Veterinary Parasitology*, 194: 35-39.
- Cerneza, M., Cristina, R.T., Stefanut, L.C., Madeira de Carvalho, L.M., Taulescu, M.A., Cozma, V. (2015). Screening for anthelmintic resistance in equine strongyles (Nematoda) in Romania. *Folia Parasitologica*, 62: doi: 10.14411/fp.2015.023.
- Chapman, M.R., French, D.D., Monahan, C.M., Klei, T.R. (1996). Identification and characterization of a pyrantel pamoate resistant cyathostome population. *Veterinary Parasitology*, 66: 205–212.
- Churcher, T.S., Kaplan, R.M., Ardelli, B.F., Schwenkenbecher, J.M., Basáñez, M.G., Lammie, P.L. (2010). Mass treatment of parasitic disease: implications for the development and spread of anthelmintic resistance. In: Webber, J.T. (Ed.), *Antimicrobial Resistance-Beyond the Breakpoint, Issues in Infectious Diseases*. Karger, Basel, pp. 120-137.
- Coles, G.C., Tritschler II, J.J., Giordano, D.J., Laste, N.J., Schmidt, A.L. (1988). A larval development test for detection of anthelmintic resistant nematodes. *Research in Veterinary Science*, 45: 50-53.
- Coles, G.C., Jackson, F., Pomroy, W.E., Prichard, R.K., von Samson-Himmelstjerna, G., Silvestre, A., Taylor, M.A., Vercruyse, J. (2006). The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*, 136(3-4): 167-185.
- Corbett, C.J., Love, S., Moore, A., Burden, F.A., Matthews, J.B., Denwood, M.J. (2014). The effectiveness of faecal removal methods of pasture management to control the cyathostomin burden of donkeys. *Parasites & Vectors*, 7: 48.
- Craig, T.M., Diamond, P.L., Ferwerda, N.S., Thompson, J.A. (2007). Evidence of ivermectin resistance by *Parascaris equorum* on a Texas horse farm. *Journal of Equine Veterinary Science*, 27: 67-71.

- Craven J., Bjorn H., Henriksen S.A., Nansen P., Larsen M., Lendal S. (1999). Survey of anthelmintic resistance on Danish horse farms, using 5 different methods of calculating faecal egg count reduction. *Equine Veterinary Journal*, 30: 289-293.
- Cringoli, G., Rinaldi, L., Veneziano, V., Capelli, G., Scala, A. (2004). The influence of flotation solution, sample dilution and the choice of McMaster slide area (volume) on the reliability of the McMaster technique in estimating the faecal egg counts of gastrointestinal strongyles and *Dicrocoelium dendriticum* in sheep. *Veterinary Parasitology*, 123(1-2): 121-131.
- Cringoli, G., Rinaldi, L., Maurelli, M.P., Utzinger, J. (2010). FLOTAC: new multivalent techniques for qualitative and quantitative copromicroscopic diagnosis of parasites in animal and humans. *Nature Protocols*, 5: 503-511.
- Cringoli, G., Rinaldi, L., Albonico, M., Bergquist, R., Utzinger, J. (2013). Geospatial (s)tools: integration of advanced epidemiological sampling and novel diagnostics. *Geospatial Health*, 7: 399-404.
- Cringoli, G., Maurelli, M.P., Levecke, B., Bosco, A., Vercruysse, J., Utzinger, J., Rinaldi, R. (2017). The Mini-FLOTAC technique for the diagnosis of helminth and protozoan infections in humans and animals. *Nature Protocols*, 12: 1723-1732.
- Daniels, S.P. e Proudman, C.J. (2016). Shortened egg reappearance period after ivermectin or moxidectin use in horse in the UK. *The Veterinary Journal*, 218: 36-39.
- Demeulenaere, D., Vercruysse, J., Dorny, P., Claerebout, E. (1997). Comparative studies of ivermectin and moxidectin in the control of naturally acquired cyathostome infections in horses. *Veterinary Record*, 15: 383-386.
- De Lima Saes, I., Vera, J.H.S., Fachioli, D.F., Yamada, P.H., Dellaqua, J.V.T., de Lima Saes, R., Amarante, A.F.T., Soutello, R.V.G. (2016). Time required by different anthelmintics to reach expected efficacy levels in horses infected by strongyles. *Veterinary Parasitology*, 229: 90-92.
- Dias de Castro, L.L., Abrahão, C.L.H., Buzatti, A., Molento, M.B., Bastianetto, E., Rodrigues, D.S., Lopes, L.B., Silva, M.X., Green de Freitas, M., Conde, M.H., de Almeida Borges, F. (2017). Comparison of McMaster and Mini-Flotac fecal egg count techniques in cattle and horses.
- DiPietro, J.A., Hutchens, D.E., Lock, T.F., Walker, K., Pau, A.J., Shipley, C., Rulli, D. (1997). Clinical trial of moxidectin oral gel in horses. *Veterinary Parasitology*, 72: 167-177.
- Dowdall, S.M.J., Matthews, J.B., Murphy, D., Love, S., Proudman, C.J. (2002). Antigen-specific IgG(T) responses in natural and experimental cyathostomin infection. *Veterinary Parasitology*, 106: 225-242.
- Dowdall, S.M.J., Proudman, C.J., Klei, T.R., Mair, T.S., Matthews, J.B. (2004). Antigen-specific IgGT responses as a marker for larval cyathostomin infection. *International Journal for Parasitology*, 34: 101-108.
- Drudge, J.H. e Lyons, E.T. (1965). Newer developments in helminth control and *Strongylus vulgaris* research. In: 11th Annual Meeting of the American Association of Equine Practitioners, Miami Beach, FL. pp. 381-389.
- Duncan, J.L., Abbott, E.M., Arundel, J.H., Eysker, M., Klei, T.R., Krecek, R.C., Lyons, E.T., Reinemeyer, C., Slocombe, J.O. (2002). World association for the advancement of veterinary parasitology (WAAVP): second edition of guidelines for evaluating the efficacy of equine anthelmintics. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP). *Veterinary Parasitology*, 103: 1-18.

- Fangama, M.I., Seri, H.I., Suliman, S.E., Imam, S.M.A., Mozamel, E.A. (2013). Comparative efficacy evaluation of moxidectin and ivermectin injectable formulation against helminthes infestation of donkeys (*Equus asinus*) in Sudan. *Assiut Veterinary Medical Journal*, 59(137): 1-8.
- Felippelli, G., Cruz, B.C., Gomes, L.V., Lopes, W.D., Teixeira, W.F., Maciel, W.G., Buzzulini, C., Bichuette, M.A., Campos, G.P., Soares, V.E., Bergamasco, P.L., de Olivera, G.P., da Costa, A.J. (2015). Susceptibility of helminth species from horses against different chemical compounds in Brazil. *Veterinary Parasitology*, 212: 232-238.
- Fisher, J.K., Hinney, B., Denwood, M.J., Traversa, D., von Samson-Himmelstjerna, G. (2015). Efficacy of selected anthelmintic drugs against cyathostomins in horse in the federal state of Brandenburg, Germany. *Parasitology Research*, 114(12): 4441-4450.
- Francisco, R., Paz-Silva, A., Francisco, I., Cortinas, F.J., Miguélez, S., Suárez, J., Sánchez-Andrade, R. (2012). Preliminary analysis of the results of selective therapy against strongyles in pasturing horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, 32: 274-280.
- Garcia, A., Brady, H.A., Nichols, W.T., Prien, S. (2013). Equine cyathostomin resistance to fenbendazole in Texas horse facilities. *Journal of Equine Veterinary Science*, 33: 223-228.
- Genchi, M., Traldi, G., Genchi, C. (2014). Manuale di Parassitologia Veterinaria. Casa Editrice Ambrosiana.
- Geurden, T., Betsch, J.M., Maillard, K., Vanimisetti, B., D'Espois, M., Besognet, B. (2013). Determination of anthelmintic efficacy against equine cyathostomins and *Parascaris equorum* in France. *Equine Veterinary Education*, 25: 304-307.
- Geurden, T., van Doorn, D., Claerebout, E., Kooyman F., De Keersmaecker, S., Vercruyse, J., Besognet, B., Vanimisetti, B., di Regalbono, A.F., Beraldo, P., Di Cesare, A., Traversa, D. (2014). Decreased strongyle egg re-appearance period after treatment with ivermectin and moxidectin in horses in Belgium, Italy and The Netherlands. *Veterinary Parasitology*, 204: 291-296.
- Gibson, T.E. (1953). The effect of repeated anthelmintic treatment with phenothiazine on fecal egg counts of housed horses, with some observations on the life cycle of *Trichonema* spp. in the horse. *Journal of Helminthology*, 27: 29-40.
- Gill, J.H., Redwin, J.M., van Wyk, J.A., Lacey, E. (1995). Avermectin inhibition of larval development in *Haemonchus contortus* – effects of ivermectin resistance. *International Journal for Parasitology*, 25: 463-470.
- Gordon, H. e Whitlock, H.V. (1939). A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. *Journal Council for Scientific and Industrial Research*, 12. 50-52.
- Hearn, F.P. e Peregrine, A.S. (2003). Identification of foals infected with *Parascaris equorum* apparently resistant to Ivermectin. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 15: 482-485.
- Hernández, J.A., Arroyo, F.L., Suárez, J., Cazapal-Monteiro, C.F., Romasanta, Á, López-Arellano, M.E., Pedreira, J., Madeira de Carvalho, L.M., Sánchez-Andrade, R., Arias, M.S., de Gives, P.M., Paz-Silva, A. (2016). Feeding horses with industrially manufactured pellets with fungal spores to promote nematode integrated control. *Veterinary Parasitology*, 229: 37-44.
- Hubert, J. & Kerboeuf, D. (1992). A microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Veterinary Record*, 130: 442-446.

- Hunt, K.R., Taylor, M.A. (1989). Use of the egg hatch assay on sheep faecal samples for the detection of benzimidazole resistant worms. *Veterinary Record*, 125: 153-154.
- Jacobs, D.E., Hutchinson, M.J., Parker, L., Gibbons, L.M. (1995). Equine cyathostome infection. Suppression of faecal egg output with moxidectin. *Veterinary Record*, 137: 545.
- Kaplan, R.M. (2002). Anthelmintic resistance in nematodes of horses. *Veterinary Research*, 33: 491–507.
- Kaplan, R.M., Klei, T.R., Lyons, E.T., Lester, G., Courtney, C.H., French, D.D., Tolliver, S.C., Vidyashankar, A.N., Zhao, Y. (2004). Prevalence of anthelmintic resistant cyathostomes on horse farms. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 225: 903-910.
- Kaplan, R.M. e Nielsen, M.K. (2010). An evidence-based approach to equine parasite control: It ain't the 60s anymore. *Equine Veterinary Education*, 22: 306-316.
- Königová, A., Várady, M., Corba, J., 2003. Comparison of in vitro methods and faecal egg count reduction test for the detection of benzimidazole resistance in small strongyles of horses. *Veterinary Research Communication*, 27: 281–288.
- Kumar, R.R. e Vatsya, S. (2014). Comparative efficacy of fenbendazole and ivermectin against equine strongylosis. *Compendium and Abstracts of National Conference on Emerging Problems and Recent Advances in Applied Sciences: Basic to Molecular Approaches, CCS University, Meerut, February 8–9*. p. 371
- Kumar, S., Garg, R., Kumar, S., Banerjee, P.S., Ram, H., Prasad, A. (2016). Benzimidazole resistance in equine cyathostomins in India. *Veterinary Parasitology*, 218: 93-97.
- Kuzmina, T.A., Kuzmin, Y.I., Kharchenko, V.A. (2006). Field study on the survival, migration and overwintering of infective larvae of horse strongyles on pasture in central Ukraine.
- Lassen, B. e Peltola, S.M. (2015). Anthelmintic resistance of intestinal nematodes to ivermectin and pyrantel in Estonia horses. *Journal of Helminthology*, 89: 760-763.
- Laugier, C., Sevin, C., Menard, S., Maillard, K. (2012). Prevalence of *Parascaris equorum* infection in foals on French stud farms and first report of ivermectin-resistant *P. equorum* populations in France. *Veterinary Parasitology*, 188, 185–189.
- Lawson, E., Burden, F., Elsheikha, H.M. (2015). Pyrantel resistance in two herds of donkeys in the UK. *Veterinary Parasitology*, 207: 346-349.
- Leathwick, D.M. (2012). Modelling the benefits of releasing a new class of anthelmintic in combination. *Veterinary Parasitology*, 186: 93-100.
- Leathwick, D.M., Miller, C.M., Atkinson, D.S., Haack, N.A., Waghorn, T.S., Oliver, A.M. (2008). Managing anthelmintic resistance: Untreated adult ewes as a source of unselected parasites, and their role in reducing parasite populations. *The New Zealand Veterinary Journal*, 56: 184-195.
- Leathwick, D.M., Waghorn, T.S., Miller, C.M., Candy, P.M., Oliver, A.M.B. (2012). Managing anthelmintic resistance — use of a combination anthelmintic and leaving some lambs untreated to slow the development of resistance to ivermectin. *Veterinary Parasitology*, 187: 285–294.
- Leathwick, D.M. e Besier, R.B. (2014). The management of anthelmintic resistance in grazing ruminants in Australasia – strategies and experiences. *Veterinary Parasitology*, 204: 44-54.

- Lester, H.E., Spanton, J., Stratford, C.H., Bartley, D.J., Morgan, E.R., Hodgkinson, J.E., Coumbe, K., Mair, T., Swan, B., Lemon, G., Cookson, R., Matthews, J.B. (2013a). Anthelmintic efficacy against cyathostomins in horses in Southern England. *Veterinary Parasitology*, 197: 189-196.
- Lester, H.E., Bartley, D.J., Morgan, E.R., Hodgkinson, J.E., Stratford, C.H., Matthews, J.B. (2013b). A cost comparison of faecal egg count-directed anthelmintic delivery versus interval programme treatments in horses. *Veterinary Record*, doi: 10.1136/vr.101804.
- Lester, H.E. e Matthews, J.B. (2014). Faecal egg worm count analysis for targeting anthelmintic treatment in horses: points to consider. *Equine Veterinary Journal*, 46: 139-145.
- Le Jambre, L.F. (1976). Egg hatch as an in vitro assay of thianbendazole resistance in nematodes. *Veterinary Parasitology*, 2: 385-391.
- Lind, E.O. e Christensson, D. (2009). Anthelmintic efficacy on *Parascaris equorum* in foals on Swedish studs. *Acta Veterinaria Scandinavica* 51, 45.
- Lindgren, K., Ljungvall, Ö, Nilsson, O., Ljungström, B-L., Lindahl, C., Höglund, J. (2008). *Parascaris equorum* in foals and in their environment on a Swedish stud farm, with notes on treatment failure of ivermectin. *Veterinary Parasitology*, 151: 337-343.
- Lyons, E.T., Tolliver, S.C., Drudge, J.H., Collins, S.S. Swerczek, T.W. (2001). Continuance of studies on Population S benzimidazole-resistance small strongyles in a Shetland pony herd in Kentucky: effect of pyrantel pamoate (1992-1999). *Veterinary Parasitology*, 94: 247-256.
- Lyons, E.T., Tolliver, S.C., Ionita, M., Collins, S.S., (2008). Evaluation of parasitocidal activity of fenbendazole, ivermectin, oxibendazole, and pyrantel pamoate in horse foals with emphasis on ascarids (*Parascaris equorum*) in field studies on five farms in Central Kentucky in 2007. *Parasitology Research*, 103: 287-291.
- Lyons, E.T., Tolliver, S.C., Collins, S.S. (2009). Probable reason why small strongyle EPG counts are returning “early” after ivermectin treatment of horses on a farm in Central Kentucky. *Parasitology Research*, 104: 569-574.
- Lyons, E.T., Tolliver, S.C., Kuzmina, T.A., Collins, S.S. (2010). Critical tests evaluating efficacy of moxidectin against small strongyles in horses from a herd for which reduced activity had been found in field tests in Central Kentucky. *Parasitology Research*, 107: 1495-1498.
- Lyons, E.T., Tolliver, S.C., Collins, S.S., Ionita, M., Kuzmina, T.A., Rossano, M. (2011). Field tests demonstrating reduced activity of ivermectin and moxidectin against small strongyles in horses on 14 farms in Central Kentucky in 2007-2009. *Parasitology Research*, 108: 355-360.
- M.A.F.F.: Manual of veterinary parasitological laboratory techniques, 1986.
- Martin, P.J., Le Jambre, L.F., Claxton, J.H. (1981). The impact of refugia on the development of thiabendazole resistance in *Haemonchus contortus*. *International Journal for Parasitology*, 11: 35-41.
- Martin, P.J., Anderson, N., Jarrett, R.G. (1989). Detecting benzimidazole resistance with faecal egg count reduction tests and in vitro assays. *Australian Veterinary Journal*, 66: 236-240.

- Matthews, J.B. (2008). An update on cyathostomins: anthelmintic resistance and worm control. *Equine Veterinary Education*, 20: 552–560.
- Matthews, J.B., McArthur, C., Robinson, A., Jackson, F. (2012). The in vitro diagnosis of anthelmintic resistance in cyathostomins. *Veterinary Parasitology*, 185(1): 25-31.
- Matthews, J.B. (2014). Anthelmintic resistance in equine nematodes. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 4: 310-315.
- Matthews, J.B. e Burden, F. (2013). Common helminth infections of donkeys and their control in temperate regione. *Equine Veterinary Education*, 25(9): 461-467.
- Matthews, J.B. e Lester, H.E. (2015). Control of equine nematodes: making the most of faecal egg count. *In Practice*, 37: 540-544.
- McBeath, D.G., Best, J.M., Preston, N.K., Duncan, J.L. (1978). Studies on the faecal egg output of horses after treatment with fenbendazole. *Equine Veterinary Journal*, 10, 5-8.
- McWilliam, H.E.G., Nisbet, A.J., Dowdall, S.M.J., Hodgkinson, J.E., Matthews, J.B. (2010). Identification and characterisation of a potential immunodiagnostic marker for larval cyathostominosis. *International Journal for Parasitology*, 40: 265–275.
- Milillo, P., Boeckh, A., Cobb, R., Otranto, D., Lia, R.P., Perrucci, S., di Regalbono, A.F., Beraldo, P., von Samson-Himmelstjerna, G., Demelr, J., Bartolini, R., Traversa, D. (2009). Faecal cyathostomin egg count distribution and efficacy of anthelmintics against cyathostomins in Italy: a matter of geography? *Parasites & Vectors*, 2(2): S4.
- Molento, M.B., Antunes, J., Bentes, R.N., Coles, G.C. (2008). Anthelmintic resistant nematodes in Brazilian horses. *Veterinary Record*, 162: 384-385.
- Näreaho, A., Vainio, K., Oksanen, A. (2011). Impaired efficacy of ivermectin against *Parascaris equorum*, and both ivermectin and pyrantel against strongyle infections in trotter foals in Finland. *Veterinary Parasitology*, 182: 372–377.
- Nielsen, M.K., Kaplan, R.M., Thamsborg, S.M., Monrad, J., Olsen, S.N. (2007). Climatic influences on development and survival of free-living stages of equine strongyles: implications for worm control strategies and managing anthelmintic resistance. *Veterinary Journal*, 174: 23–32.
- Nielsen, M.K., Vidyashankar, A.N., Olsen, S.N., Monrad, J., Thamsborg, S.M. (2012). *Strongylus vulgaris* associated with usage of selective therapy on Danish horse farms – is it reemerging? *Veterinary Parasitology*, 189: 260-266.
- Nielsen, M.K., Mittel, L., Grice, A., Erskine, M., Graves, E., Vaala, W., Tully, R.C., French, D.D., Bowman, R., Kaplan, R.M. (2013a). AAEP Parasite Control Guidelines. *American Association of Equine Practitioners*. On-line at www.aaep.org.
- Nielsen, M.K., Vidyashankar, A.N., Hanlon, B.M., Ciao, G., Petersen, S.L., Kaplan, R.M (2013b). Hierarchical model for evaluating pyrantel efficacy against strongyle parasites in horses. *Veterinary Parasitology*, 197: 614-622.
- Nielsen, M.K. Vidyashankar, A.N., Gravatte, H.S., Bellaw, J., Lyons, E.T., Andersen, U.V. (2014). Development of *Strongylus vulgaris*-specific serum antibodies in naturally infected foals. *Veterinary Parasitology*, 200(1-3): 265-270.
- Noel, M.L., Scare, J.A., Bellaw, J.L., Nielsen, M.K. (2017). Accuracy and precision of Mini-Flotac and McMaster techniques for determining equine strongyle egg counts. *Journal of Equine Veterinary Science*, 48: 182-187.
- Pacifico, L. (2014). Efficacia del moxidectina gel orale in asini naturalmente infettati da Cyathostominae. Tesi di Laurea. Università degli Studi di Napoli, Federico II.

- Peregrine, A.S., Molento, M.B., Kaplan, R.M., Nielsen, M.K. (2014). Anthelmintic resistance in important parasites of horses: does it really matter? *Veterinary Parasitology*, 201: 1-8.
- Presland, S.L., Morgan, E.R., Coles, G.C. (2005). Counting nematode eggs in equine faecal samples. *Veterinary Record*, 156: 208-210.
- Relf, V.E., Lester, H.E., Morgan, E.R., Hodgkinson, J.E., Matthews, J.B. (2014). Anthelmintic efficacy on UK Thoroughbred stud farms. *Internal Journal of Parasitology*, 44: 507-514.
- Roepstorff, A. e Nansen, P. (1998). Epidemiology, diagnosis and control of elminth parasites of swine. In: FAO Animal Health Manual No. 3. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Rossano, M.G., Smith, A.R., Lyons, E.T. (2010). Shortened strongyle-type egg reappearance periods in naturally infected horses treated with moxidectin and failure of a larvicidal dose of fenbendazole to reduce fecal egg counts. *Veterinary Parasitology*, 173: 349-352.
- Sangster, N.C. (1999). Pharmacology of anthelmintic resistance in cyathostomes: will it occur with the avermectin/milbemycins? *Veterinary Parasitology*, 85: 189-201.
- Schougaard, H. e Nielsen, M.K. (2007). Apparent ivermectin resistance of *Parascaris equorum* in foals in Denmark. *Veterinary Record*, 160: 439-440.
- Schankova, S., Marsalek, M., Wagnerova, P., Lukesova, D., Starostova, L., Jankovska, I., Cadkova, Z., Kudmacova, M., Brozova, A., Truneckova, J., Langrova, I. (2013). Treatment failure of ivermectin for *Oxyuris equi* in naturally infected ponies in Czech Republic. *Helminthologia*, 50: 232-234.
- Slocombe, J.O.D., de Gannes, R.V.G., Lake, M.C. (2007). Macrocyclic lactone resistant *Parascaris equorum* on stud farms in Canada and effectiveness of fenbendazole and pyrantel pamoate. *Veterinary Parasitology*, 145: 371-376.
- Smith, M.A., Nolan, T.J., Rieger, R., Aceto, H., Levine, D.G., Nolen-Walston, R., Smith, B.I. (2015). Efficacy of major anthelmintics for reduction of fecal shedding of strongyle-type eggs in horses in the Mid-Atlantic region of the United States. *Veterinary Parasitology*, 214(1-2): 139-143.
- Stratford, C.H., Lester, H.E., Pickles, K.J., McGorum, B.C., Matthews, J.B. (2014). An investigation of anthelmintic efficacy against strongyles on equine yards in Scotland. *Equine Veterinary Journal*, 46: 17-24.
- Taylor, M.A. (1990). A larval development test for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of sheep. *Research in Veterinary Science*, 49(2): 198-202.
- Taylor, M.A., Hunt, K.R., Goodyear, K.L. (2002). Anthelmintic resistance detection methods: a review. *Veterinary Parasitology*, 103: 183-194.
- Traversa, D., Klei, T.R., Iorio, R., Paoletti, B., Lia, R.P., Otranto, D., Sparagano, P.A., Giangaspero, A. (2007). Occurrence of anthelmintic resistant equine cyathostome populations in central and southern Italy. *Preventive Veterinary Medicine*, 82: 314-320.
- Traversa, D., von Samson-Himmelstjerna, G., Demeler, J., Milillo, P., Schurmann, S., Barnes, H., Otranto, D., Perrucci, S., di Regalbono, A.F., Beraldo, P., Boeckh, A., Cobb, R. (2009). Anthelmintic resistance in cyathostomin populations from horse yards in Italy, United Kingdom and Germany. *Parasites & Vectors*, 2(2): S2.
- Traversa, D., Castagna, G., von Samson-Himmelstjerna, G., Meloni, S., Bartolini, R., Geurden, T., Pearce, M.C., Woringer, E., Besognet, B., Milillo, P., D'Espois, M.

- (2012). Efficacy of major anthelmintics against horse cyathostomins in France. *Veterinary Parasitology*, 188: 294-300.
- Trawford, A.F., Burden, F., Hodgkinson, J.E. (2005). Suspected moxidectin resistance in cyathostomes in two donkeys herds at the Donkey Sanctuary, UK. *In: Proceedings of 20th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology*, New Zealand. p. 146.
- Tzelos, T. e Matthews, J.B. (2016). Anthelmintic resistance in equine helminths and mitigating its effects. *In Practice*, 38: 489-499.
- van Doorn, D.C.K., Ploeger, H.W., Eysker, M., Geurden, T., Wagenaar, J.A., Kooyman, F.N.J. (2014). *Cylicocyclus* species predominate during shortened egg reappearance period in horses after treatment with ivermectin and moxidectin. *Veterinary Parasitology*, 206: 246-252.
- van Wyk, J.A. (2001). Refugia-overlooked as perhaps the most potent factor concerning the development of anthelmintic resistance. *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 68(1): 55-67.
- Varady, M., Čorba, J., Letková, V., Kováč, G. (2009). Comparison of two version of larval development test to detect anthelmintic resistance in *Haemoncus contortus*. *Veterinary Parasitology*, 160(3-4): 267-271.
- Veronesi, F., Moretta, I., Moretti, A., Fioretti, D.P., Genchi, C. (2009). Field effectiveness of pyrantel and failure of *Parascaris equorum* egg count reduction following ivermectin treatment in Italian horse farms. *Veterinary Parasitology*, 161: 138-141.
- Veronesi, F., Fioretti, D.P., Genchi, C. (2010). Are macrocyclic lactones useful drugs for the treatment of *Parascaris equorum* infections in foals? *Veterinary Parasitology*, 172: 164-167.
- Vidyashankar, A.N., Hanlon, B.M., Kaplan, R.M. (2012). Statistical and biological considerations in evaluating drug efficacy in equine strongyle parasites using fecal egg count data. *Veterinary Parasitology*, 185: 45-56.
- von Samson-Himmelstjerna, G., von Fritzen, B., Demeler, J., Schuermann, S., Rohn, K., Schnieder, T., Epe, C. (2007). 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. *Veterinary Parasitology*, 144: 74-80.
- Waghorn, T.S., Leathwick, D., Miller, C., Atkinson, D. (2008). Brave or gullible: testing the concept that leaving susceptible parasites in refugia will slow the development of anthelmintic resistance. *The New Zealand Veterinary Journal*, 56: 158-163.
- Waghorn, T.S., Miller, C.M., Oliver, A.M., Leathwick, D.M. (2009). Drench-and-shift is a high-risk practice in the absence of refugia. *The New Zealand Veterinary Journal*, 57: 359-363.
- Wirtherle, N., Schnieder, T., von Samson-Himmelstjerna, G. (2004). Prevalence of benzimidazole resistance on horse farms in Germany. *Veterinary Record*, 154: 39-41.
- Wolf, D., Hermosilla, C., Taubert, A. (2014). *Oxyuris equi*: lack of efficacy in treatment with macrocyclic lactones. *Veterinary Parasitology*, 201: 163-168.

Capitolo 5

Studio sulle principali elmintosi nelle aziende asinine in Italia

5.1 Introduzione

Nell'asino le infezioni da elminti e le problematiche ad esse connesse appaiono sottovalutate e nel complesso poco studiate. Le indagini epidemiologiche volte a valutare la presenza delle endoparassitosi dell'asino in Italia sono scarse, frammentarie ed a carattere locale (Veneziano e Veronesi, 2015). Nel nostro Paese, in letteratura sono presenti solo tre studi: uno condotto in Sicilia su 119 asini allevati in sei aziende (Giannetto et al., 2008), un secondo in Emilia Romagna che ha interessato una grande azienda biologica testando 72 soggetti (Trentini et al., 2010) ed un terzo che ha indagato sul quadro parassitologico degli asinelli del Parco Nazionale dell'Asinara in Sardegna su 91 animali (Garippa et al., 2016).

In questo capitolo si riportano i primi due obiettivi del percorso di dottorato di ricerca:

- ✓ Effettuare una questionnaire survey sulle differenti pratiche di allevamento e management nelle aziende asinine in Italia con particolare attenzione alle pratiche di controllo antiparassitario e alle differenti molecole utilizzate;
- ✓ Effettuare uno studio epidemiologico a carattere nazionale nelle aziende asinine in Italia al fine di valutare il quadro parassitologico aziendale, con particolare riferimento alla presenza e diffusione delle principali elmintosi;

5.2 Materiali e Metodi

5.2.1 Area di Studio

L'Italia, suddivisa in Italia continentale, peninsulare e insulare, è collegata attraverso la catena dell'Alpi al continente Europeo. Il suo suolo ha differenti caratteristiche (vulcanico, endolagunare, calcareo); le zone collinari sono prevalenti rispetto a quelle montuose e pianeggianti e la sua altitudine è di circa 337 metri s.l.m. Compresa tra il 47° ed il 35° parallelo nord, si trova quasi al centro della zona temperata dell'emisfero boreale. I mari che la circondano ne influenzano il clima che viene definito temperato mediterraneo.

Lo studio è stato condotto, tra il 2014 ed il 2016, in 13 regioni del territorio italiano: 4 regioni del Sud Italia (Basilicata, Campania, Calabria e Puglia), 6 regioni del Centro Italia (Abruzzo, Lazio, Marche, Molise, Toscana, Umbria), 2 regioni del Nord Italia (Lombardia e Piemonte), 1 isola (Sicilia).

5.2.2 Estrazione del campione e Questionnaire survey

In studi condotti sui ruminanti (Cringoli et al., 2002) per l'estrazione del campione è stata considerata come "unità epidemiologica" l'allevamento. In considerazione che, per gli equidi (cavalli ed asini) l'approccio al controllo delle parassitosi è basato sul "caso singolo" e quindi sul singolo soggetto, per questa indagine, ciascun asino è stato considerato come "unità epidemiologica".

La dimensione del campione è stata ottenuta secondo la formula proposta da Thrusfield (2005) considerando i seguenti parametri:

- ✓ Popolazione asinina in Italia 58.647 capi (dati AIA 2013)
- ✓ Prevalenza attesa delle endoparassitosi (80%, da Giannetto et al., 2008)
- ✓ Errore massimo ammesso (1%)
- ✓ Livello di confidenza (99%)

Prima del prelievo dei campioni presso ciascuna azienda è stato sottoposto al titolare dell'allevamento un questionario a risposte multiple e a risposte aperte che riguardavano le caratteristiche strutturali dell'azienda, l'orientamento produttivo, gli animali presenti, la tipologia aziendale (Appendice I). Nel questionario sono stati riportati per ciascun soggetto: il nome dell'asino; la razza (meticcias/pura); il genere (maschio/femmina/castrone); l'età, determinata attraverso la valutazione dei denti in accordo con la scheda di determinazione della età degli asini riportata dal *The Donkey Sanctuary* (Appendice III); il Body Condition Score (BCS) utilizzando il sistema di punteggio da 1 a 5 punti sviluppato per gli asini dal "*The Donkey Sanctuary*" (Svendsen, 1997) (Appendice IV); l'eventuale promiscuità con altri animali sia da compagnia sia da reddito (in particolare altri equidi e ruminanti); il tipo di alimentazione; la presenza o meno del pascolo; il numero di trattamenti antiparassitari effettuati nell'arco di un anno, i tempi di esecuzione dei trattamenti e le principali molecole antiparassitarie utilizzate.

5.2.3 Animali oggetto di Studio

In totale sono stati controllati, 1.775 asini (396 maschi, 1.354 femmine, 25 castroni), 838 (47,2%) di razza pura e 937 (52,8%) incroci, di età media di 7,7 anni (range 1,2 mesi – 33 anni) allevati in 77 aziende dislocate sul territorio italiano.

5.2.3 Prelievo dei campioni di feci

Da ciascun animale è stato prelevato un campione di feci direttamente dall'ampolla rettale (figura 5.1); nel caso di animali indocili e di puledri sono state raccolte da terra feci appena emesse.



Fig. 5.1 Esplorazione rettale ad un asino per prelievo copros

Tutti i campioni di feci sono stati esaminati macroscopicamente al fine di individuare la presenza di elementi parassitari. Dopo la raccolta, i campioni sono stati conservati in contenitori refrigerati a una temperatura di 4°C ed trasportati al laboratorio di “Medicina traslazionale” dell’Università degli Studi di Napoli Federico II – Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali, per poi essere analizzati entro 48 ore dal prelievo.

5.2.4 Tecniche coprologiche quali-quantitative

Nel corso di questa indagine sono stati effettuati esami individuali copromicroscopici quali-quantitativi, al fine di determinare la FEC di ogni asino. La tecnica adoperata è stata *Special modification of McMaster method* – specifica per i bovini e per gli altri grandi erbivori come gli asini Appendice V (Genchi et al., 2014) (figura 5.2 e 5.3) avente un limite di sensibilità analitica pari a 10 UPG, utilizzando una soluzione flottante a base di saccarosio con un peso specifico di 1.250 (Cringoli et al., 2004).

La conta delle uova è stata effettuata in entrambe le camere di lettura ed il numero delle UPG è stato calcolato sommando le uova contate nelle due camere moltiplicando il valore ottenuto per 10.

In base alla morfologia delle uova (Zajac e Conboy, 2011), sono state differenziate le positività e le uova per grammo di feci (UPG) degli Strongili Intestinali, *Parascaris* spp., *Strongyloides westeri* e larve di *Dictyocaulus arnfieldi*. Per *Oxyuris equi* si è riportata la positività.



Fig. 5.2 Camere di McMaster

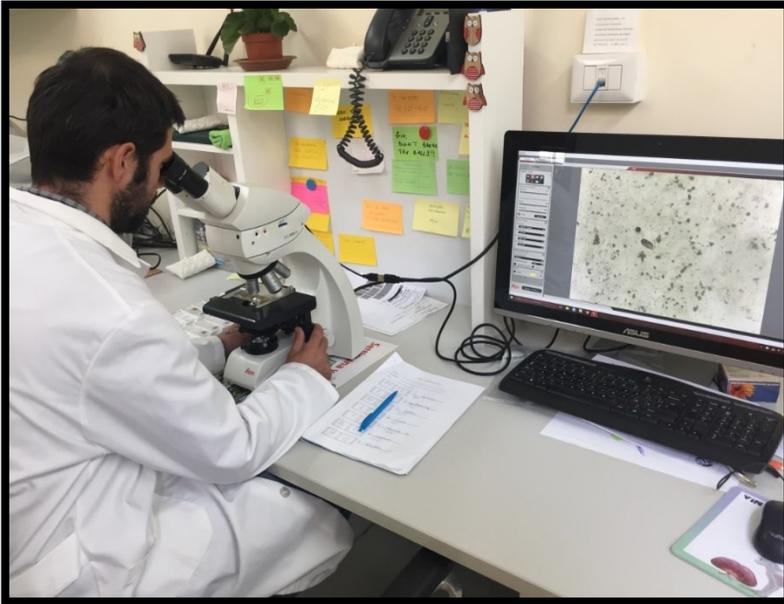


Fig. 5.3 Lettura al microscopio di camera McMaster

Per ciascun soggetto sono state inoltre ricercate uova di cestodi seguendo la tecnica di centrifugazione/flottazione delle uova di anoplocefalidi degli equidi proposta da Proudman ed Edwards (1992) (figura 5.4)



Fig. 5.4 Esecuzione del Proudman Test

Sono state inoltre ricercate le uova di distomi (*Fasciola hepatica*) previo arricchimento mediante sedimentazione in *aqua fontis* (figura 5.5), (MAFF, 1986).

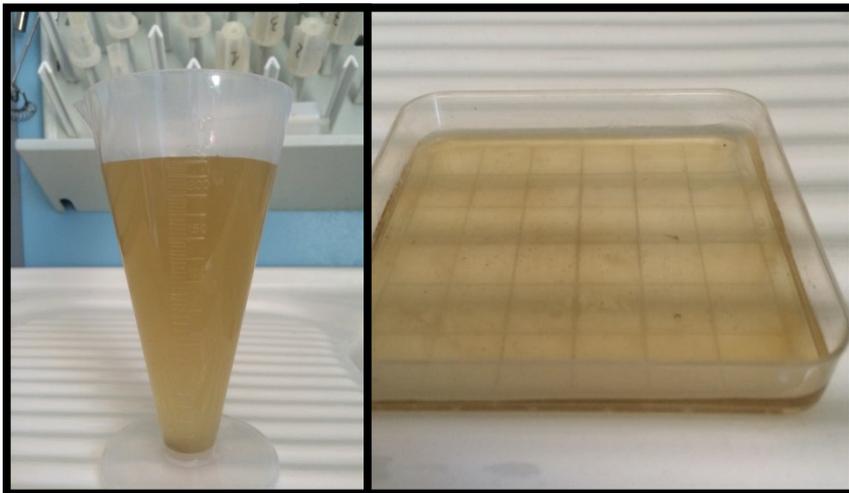


Fig. 5.5 Sedimentazione per la ricerca delle uova di trematodi

5.2.5 Esami coprocolturali

In laboratorio sono state allestite coprocolture per ogni azienda con pool di massimo 5 asini al fine di consentire la crescita *in vitro* delle larve di SI eventualmente presenti nelle feci. I campioni fecali sono stati mescolati con acqua e vermiculite ed incubati in apposite vaschette di plastica per 7-10 giorni a 25-27°C. Successivamente, si è proceduto alla raccolta delle larve di terzo stadio (L₃) con apparecchio di Baermann, per poi identificarle (fino a 100 quando disponibili), utilizzando le chiavi proposte dal MAFF (1986) e Bevilaqua et al. (1993).

5.3 Analisi statistica

La statistica descrittiva ed i grafici sono stati prodotti utilizzando uno strumento di analisi dei dati in Microsoft Excel. Per ciascun genere di elminta la positività è stata espressa in termini di prevalenza (n° positivi/esaminati) associata alla Deviazione Standard ed un Intervallo di Confidenza del 95%. Al fine di identificare i fattori di rischio associati all'infezione da parte degli strongili intestinali e *P. equorum*, è stata effettuata un'analisi univariata delle variabili studiate (genere, razza, presenza del pascolo, condivisione del pascolo con i ruminanti, condivisione del pascolo con i cavalli, BCS, età, origine geografica, densità asinina in azienda, numero dei trattamenti antiparassitari nel corso dell'anno) utilizzando il *Pearson's χ^2 test* o il *Fisher's exact test*, quando necessario. L'associazione tra ogni potenziale fattore di rischio e la prevalenza dell'infezione è stata valutata utilizzando un modello di regressione di Poisson, considerando il numero degli animali copropositivi ed il numero di animali esaminati per quella determinata variabile. Le variabili associate ad un valore $P < 0,50$ sono state successivamente analizzate attraverso un modello di Poisson multivariato. Una regressione logistica multivariata è stata quindi ottenuta utilizzando StatView 5 per Mac OS (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA).

5.4 Risultati

5.4.1 Questionnaire survey

Nel corso della *Questionnaire survey* sono stati intervistati 77 allevatori/proprietari di asini. La maggior parte delle aziende indagate erano situate nel Centro Italia, 33/77 (42,9%) per un totale di 693 asini

(39%); 21 (27,3%) in Sud Italia per un totale di 379 asini (21,4%); 14 (18,2%) in Italia insulare, per un totale di 266 asini (15%) e 9 (11,7%) localizzate nel Nord Italia, per un totale di 437 asini (24,6%).

La consistenza delle aziende era associata ad un minimo di 1 asino ad un massimo di 150 asini; l'età degli animali era compresa tra 1,2 mesi e 33 anni (con una media di 7,7 anni) (grafico 5.1).

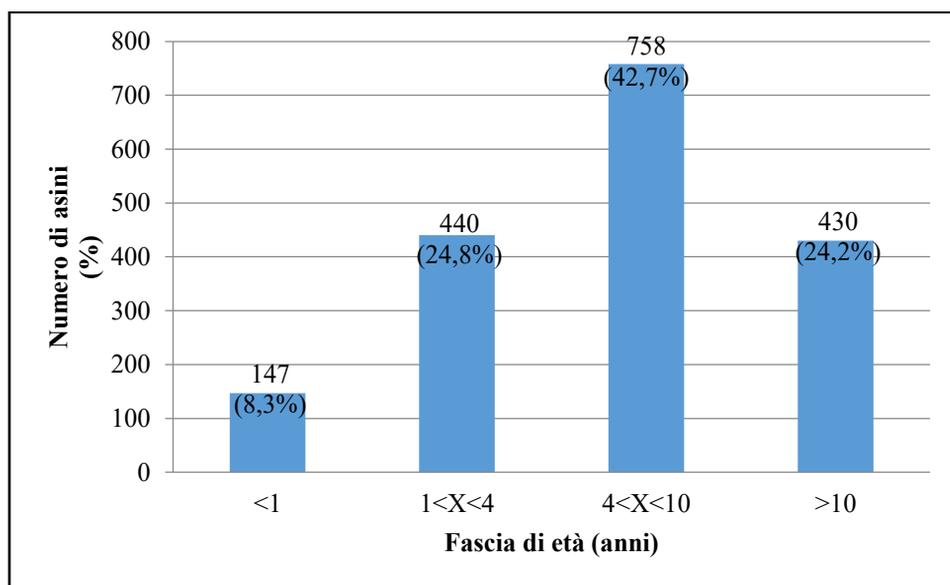


Grafico 5.1 Età degli asini nelle aziende oggetto di studio

Nelle aziende indagate il 47,2% degli asini era di razza pura mentre il 52,8% degli asini erano incroci.

In riferimento all'utilizzo/attività degli asini in azienda i dati sono indicati nel grafico che segue (grafico 5.2), precisando che uno stesso animale presentava più di una finalità.

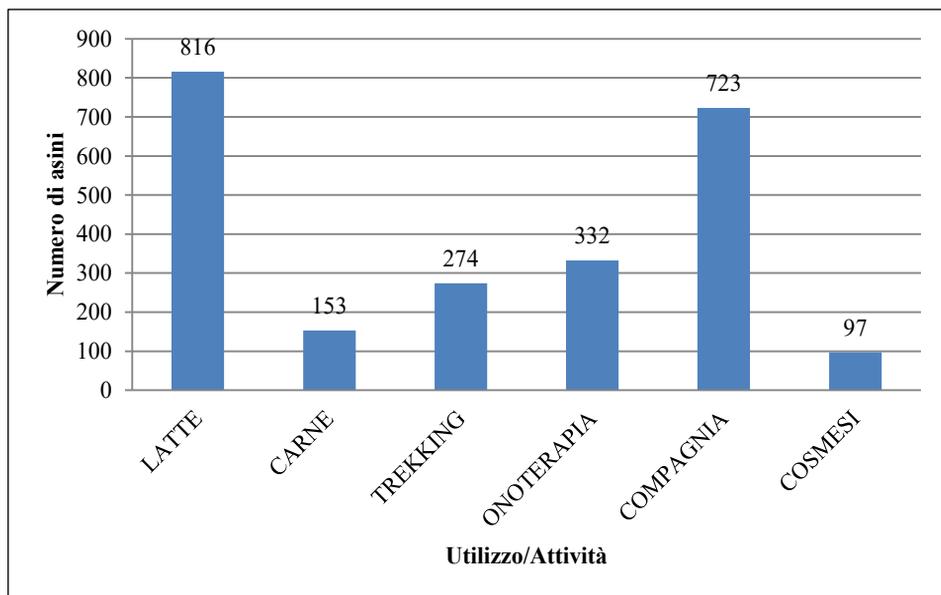


Grafico 5.2 Utilizzo degli asini nelle aziende oggetto di studio

Gli asini erano allevati principalmente per la produzione di latte e come animali da compagnia-pet.

Dei 1.775 asini oggetto di studio, 1.612 (90,8%) avevano accesso al pascolo, mentre solo 163 asini (9,2%) erano stabulati in box permanenti. La maggior parte degli asini che aveva accesso al pascolo, 1.265/1.612 (78,5%), effettuava un pascolo di tipo stanziale a differenza di una piccola parte, 347/1.612 (21,5%), che praticava invece rotazione del pascolo. Nella maggior parte dei casi (54,3%), la frequenza del pascolo era annuale (grafico 5.3).

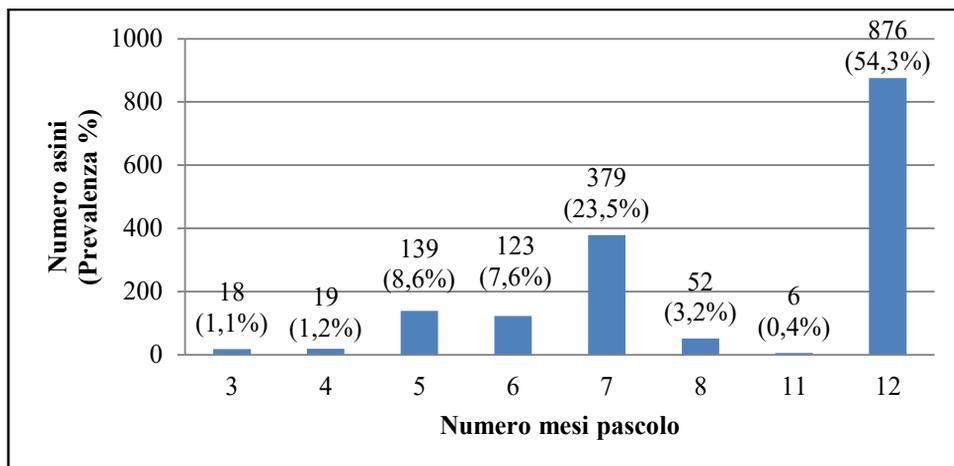


Grafico 5.3 Frequenza del pascolo degli asini nelle aziende oggetto di studio

In riferimento alla condivisione del pascolo, 336/1.612 (20,8%) animali praticavano pascolo promiscuo con ruminanti, mentre 797/1.612 (49,4%) condivideva il pascolo con i cavalli.

Nel grafico sottostante (grafico 5.4) sono riportati i valori di prevalenza di pascolo per ciascuna specie, dal quale si evince come gli asini per lo più pascolavano tra loro e con i cavalli.

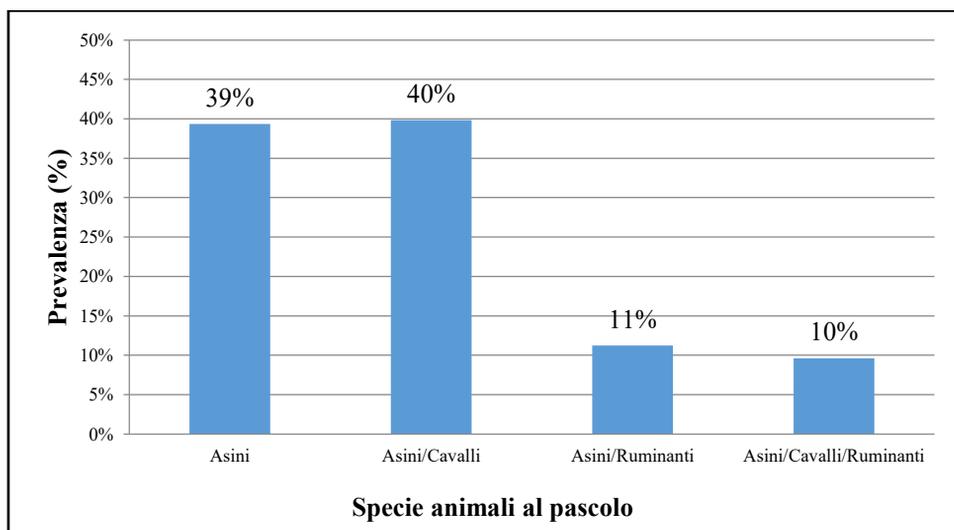


Grafico 5.4 Specie animali al pascolo nelle aziende oggetto di studio

I trattamenti antiparassitari venivano praticati a 1.557 (87,7%) asini mentre 218 (12,3%) non erano sottoposti ad alcun trattamento antielmintico. Il numero dei trattamenti antiparassitari nel corso dell'anno variava da 0 a 4 così come riportato nel grafico seguente (grafico 5.5).

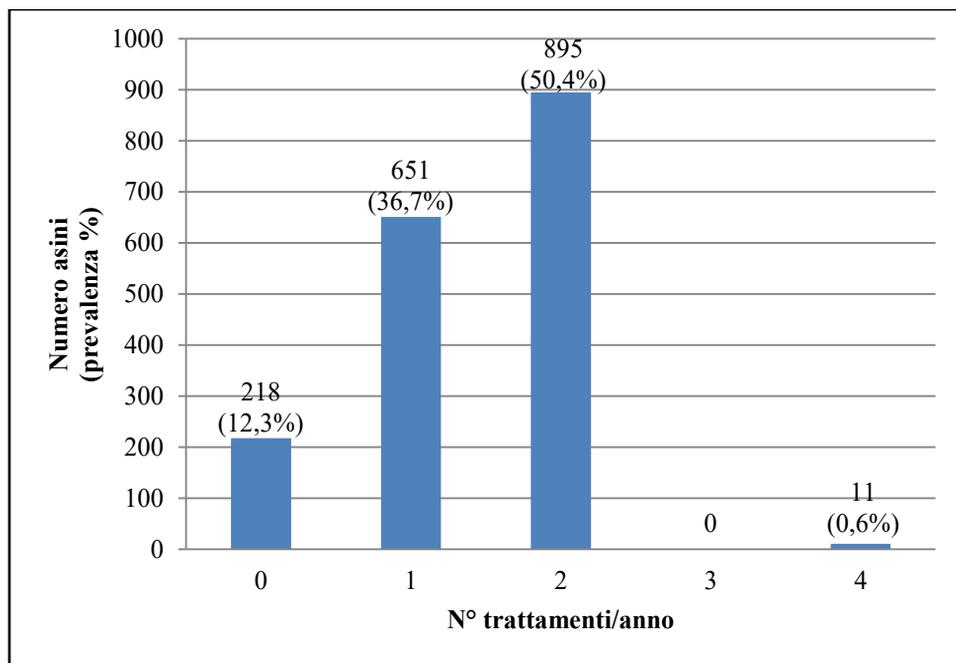


Grafico 5.5 Numero dei trattamenti antielmintici/anno degli asini nelle aziende oggetto di studio

Nella maggior parte degli asini venivano effettuati dagli 1 ai 2 trattamenti per anno. Una piccolissima percentuale di intervistati ha dichiarato di effettuare 4 trattamenti nel corso dell'anno mentre il 12,3% degli asini non venivano sottoposti ad alcun trattamento antiparassitario.

Così come avviene nei cavalli, i LM, ed in particolar modo l'IVM, rappresentano, anche nell'asino, le molecole maggiormente utilizzate, seguite dai BZ e dal PYR; raro è l'utilizzo delle associazioni farmacologiche (IVM+PZQ e/o MOX+PZQ) e dei fitoterapici (grafico 5.6).

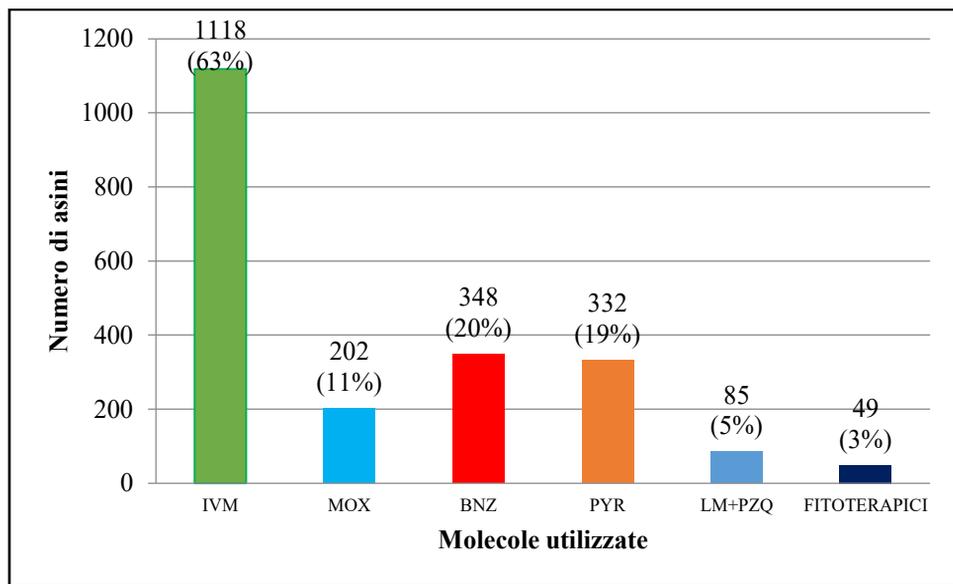


Grafico 5.6 Antelmintici somministrati agli asini nelle aziende oggetto di studio

5.4.2 Esami di laboratorio – Indagine coprologica

I risultati coprologici condotti sui 1.775 asini sono riassunti nelle tabelle seguente riportanti le positivà per azienda e per animali (tabella 5.1 e 5.2).

Tab. 5.1. Risultati degli esami coprologici quali-quantitativi delle aziende oggetto di studio

Specie e/o gruppi di parassiti	Aziende (77)	
	Numero	%
Strongili intestinali	100	100
<i>Parascaris</i> spp.	24	31,2
<i>Strongyloides westeri</i>	3	3,9
<i>Oxyuris equi</i>	22	28,6
<i>Dictyocaulus arnfieldi</i>	19	24,7
<i>Anoplocephala</i> spp.	9	11,7
<i>Fasciola hepatica</i>	0	0

Tab. 5.2. Risultati degli esami coprologici quali-quantitativi degli asini oggetto di studio.

Specie e/o gruppi di parassiti	N° asini positivi	Prevalenza (%)	Intervallo di confidenza (95%)	UPG/LPG (min-max)	MA	DS
Strongili Intestinali	1.507	84,90	[83,24-86,57]	0-9.200	599,74	734,00
<i>D. arnfieldi</i>	122	6,87	[5,70-8,05]	0-285	3,96	24,33
<i>O. equi</i>	103	5,80	[4,72-6,89]	-	-	-
<i>Parascaris</i> spp.	64	3,61	[2,74-4,47]	0	2600	123,07
<i>Anoplocephala</i> spp.	18	1,01	[0,55-1,48]	-	-	-
<i>S. westeri</i>	5	0,28	[0,04-0,53]	0-200	0,17	4,99
<i>F. hepatica</i>	0	0	-	-	-	-

UPG: uova per grammo di feci; LPG: larve per grammo di feci; DS: deviazione standard; MA: media aritmetica

Le infezioni da strongili intestinali sono state rinvenute in tutte le 77 (100%) aziende esaminate ed in 1.507/1.775 asini (84,90%).

I risultati quantitativi coprologici hanno evidenziato un valore minimo e un valore massimo di UPG rispettivamente di 0 e 9200 con un valore medio (media aritmetica \pm deviazione standard) di 599,74 \pm 734 UPG; evidenziando che la prevalenza di infezione da parte degli SI è nettamente superiore rispetto alle altre specie di parassiti riscontrate.

In base ai risultati ottenuti, 788 asini (44,4%) erano bassi eliminatori con valori di UPG al di sotto dei 300, 321 (18,1%) erano medi eliminatori (301<UPG<600), mentre 666 (37,5%) erano alti eliminatori UPG>600 (tab. 5.3); quindi, più del 55% (987/1775) degli asini era costituito da medi ed alti eliminatori.

Tab. 5.3 Intensità dell'infezione da SI in base alle UPG

	Numero asini	Prevalenza (%)	Intervallo di confidenza (95%)
Bassi eliminatori (UPG< 300)	788	44,4	[42,08-46,71]
Medi eliminatori (301<UPG<600)	321	18,1	[16,29-19,88]
Alti eliminatori (UPG>600)	666	37,5	[35,27-39,77]

Dai risultati ottenuti si evince che in 788 asini la FEC è inferiore a 300 UPG; per tale motivo, considerato che il valore di cut-off utilizzato in letteratura per il trattamento selettivo degli asini è appunto di 300 UPG (Veneziano e Veronesi, 2015), quasi il 45% dei soggetti non richiedeva un trattamento antiparassitario.

In tutte le aziende esaminate, le coproculture hanno evidenziato la presenza di L3 di Cyatostominae (100%), elevata anche la presenza di *S.*

vulgaris (31%), *Poteriostomum* spp. (25%), al di sotto del 10% erano presenti *Triodontophorus* spp. (9%), *S. edentatus* (7%), *S. equinus* (5%).

Nella tabella seguente (tabella 5.4) sono schematizzati i risultati ottenuti dalla regressione logistica univariata e multivariata al fine di valutare l'associazione tra le infezioni sostenute dagli SI e le variabili raccolte attraverso la *questionnaire survey*.

Studio sulle principali elmintosi nelle aziende asinine in Italia

Tab. 5.4 Risultati della regressione logistica univariata e multivariata per valutare l'associazione tra l'infezione da SI e le variabili valutate con la questionnaire survey.

Variabile	Categoria	N° Positivi/ N° esaminati	Prevalenza % (95 % CI)	Analisi univariata	Analisi Multivariata	
				P	OR (95 % CI)	P
Genere	Maschio	337/396	85,10 (81,59-88,61)	0,86	n.a.	
	Femmina	1152/1354	85,08 (83,45-87,22)			
	Castrone	18/25	72 (54,40-89,60)			
Razza	Incrocio	682/937	72,78 (69,94-75,64)	<0,001**	1*	-
	Pura	825/838	98,44 (97,29-99,29)		1,34	<0,001**
Pascolo	No	144/163	88,34 (83,42-93,27)	0,197	n.a.	
	Si	1363/1612	84,55 (82,79-86,32)			
Condivisone pascolo con ruminanti	Si	286/336	85,11 (81,31-88,92)	0,710	n.a.	
	No	1077/1276	84,40 (82,41-86,40)			
Condivisone pascolo con cavalli	Si	705/797	88,46 (86,24-90,68)	<0,05*	1*	-

Studio sulle principali elmintosi nelle aziende asinine in Italia

BCS	No	658/815	80,73 (78,03-83,44)	0,601	n.a.	
	<3	161/198	81,13 (75,88-86,74)			
	3	981/1133	86,58 (84-88,57)			
	>3	184/206	89,32 (85,10-93,54)			
	n.d.	181/238	76,05 (70,63-81,47)			
Età (anni)	≤1	116/147	78,91 (72,32-85,51)	0,751	n.a.	
	1 < x ≤ 4	376/440	85,45 (82,16-88,75)			
	4 < x ≤ 10	640/758	84,43 (81,85-87,01)			
	>10	375/430	87,21 (84,05-90,37)			
Origine geografica	Nord Italia	398/437	91,10 (88,40-93,75)	<0,001**	1*	
	Centro Italia	546/693	78,79 (75,74-81,83)		0,36	0<0,001*
	Sud Italia	335/379	88,39 (85,17-91,62)		0,74	0,619
	Isole	228/266	85,71 (81,51-89,92)		0,58	0,088

Studio sulle principali elmintosi nelle aziende asinine in Italia

	Piccola (≤10)	117/139	84,17 (78,10-90,44)		
Dimensione azienda	Media (11<x≤50)	628/762	82,41 (79,71-85,12)	0,291	n.a.
	Grande (> 50)	762/874	87,19 (84,97-89,40)		
	0	183/218	83,94 (79,07-88,94)		
Numero dei trattamenti/anno	1-2	1314/1546	84,99 (83,21-86,77)	0,78	n.a.
	>2	10/11	90,90 (73,94-100)		

CI: intervallo di confidenza 95%; n.a.: non applicabile; n.d.: non determinato; OR: odds ratio; P: P-value; *: reference level; **: P<0,05.

Le infezioni da *P. equorum* sono state rinvenute in tutte le 24 (31,2%) aziende esaminate ed in 64/1775 asini (3,61%). I risultati quantitativi coprologici hanno evidenziato un valore minimo e un valore massimo di UPG rispettivamente di 0 e 2600 UPG con un valore medio di 123,07 UPG.

Nella tabella seguente (tabella 5.5) sono schematizzati i risultati ottenuti dalla regressione logistica univariata e multivariata al fine di valutare l'associazione tra le infezioni sostenute da *P. equorum* e le variabili raccolte attraverso la *questionnaire survey*.

Studio sulle principali elmintosi nelle aziende asinine in Italia

*Tab. 5.5 Risultati della regressione logistica univariata e multivariata per valutare l'associazione tra l'infezione da *Parascaris* spp. e le variabili valutate con la questionnaire survey.*

Variabile	Categoria	N° Positivi/ N° esaminati	Prevalenza % (95 % CI)	Analisi univariata	Analisi multivariata	
				P	OR (95 % CI)	P
Genere	Maschio	28/396	7,07 (4,55-9,60)	0,001*	1*	-
	Femmina	36/1354	2,66 (1,80-3,52)		0,366	<0,001**
	Castrone	0/25	0 (0-0)		0	0,333
Razza	Incrocio	23/937	2,45 (1,46-3,45)	0,066	n.a.	
	Pura	41/838	4,89 (3,43-6,35)			
Pascolo	No	6/163	3,36 (0,79-6,57)	0,960	n.a.	
	Si	58/1612	3,60 (2,69-4,51)			
Condivisone pascolo con ruminanti	Si	9/336	2,68 (2,79-4,89)	0,626	n.a.	
	No	49/1276	3,84 (2,79-4,89)			
Condivisone pascolo con cavalli	Si	23/797	2,89 (1,72-4,05)	0,128	n.a.	

Studio sulle principali elmintosi nelle aziende asinine in Italia

	No	35/815	4,29 (2,90-5,69)			
BCS	<3	12/198	6,06 (2,74-9,38)	0,029**	1*	-
	3	34/1133	3 (2,01-3,99)		0,481	0,074
	>3	4/206	1,94 (0,06-3,83)		0,307	0,175
	n.d.	14/238	5,88 (2,89-8,87)		0,942	0,049**
	≤1	36/147	24,49 (17,54-31,44)		1*	-
Età (anni)	1 < x ≤ 4	19/440	4,30 (2,42-6,22)	<0,001**	0,139	0,34
	4 < x ≤ 10	4/758	0,58 (0,01-1,04)		0,016	<0,001**
	>10	5/430	1,16 (0,15-2,18)		0,035	<0,001**
	Nord Italia	2/437	0,50 (0-1,09)		1*	-
Origine geografica	Centro Italia	21/693	3,03 (1,75-4,31)	<0,001**	6,79	0,298
	Sud Italia	26/379	6,86 (4,32-9,41)		16,02	<0,001**
	Isole	15/266	5,64 (2,87-8,41)		12,99	0,054

Studio sulle principali elmintosi nelle aziende asinine in Italia

Dimensione azienda	Piccola (≤ 10)	3/139	2,15 (0-4,57)	0,035	1*	-
	Media ($11 < x \leq 50$)	30/762	3,93 (2,56-5,32%)		2,94	0,013**
	Grande (> 50)	31/874	3,54 (2,32-4,77)		1,66	0,110
Numero dei trattamenti	0	11/218	5,04 (2,14-7,95)	0,396	n.a.	
	1-2	53/1546	3,42 (2,52-4,34)			
	>2	0/11	0 (0-0)			

CI: intervallo di confidenza 95%; n.a.: non applicabile; n.d.: non determinato; OR: odds ratio; P: P-value; *: reference level; **: $P < 0,05$.

5.5 Discussioni e conclusioni

La presente indagine epidemiologica, è stata eseguita su 1.775 asini allevati in 77 aziende variamente distribuite in 13 regioni italiane.

Tale studio rappresenta la prima indagine epidemiologica riguardante le principali elmintosi intestinali degli asini in Italia. Infatti, gli unici studi effettuati nel nostro Paese, sono stati condotti in Sicilia (Giannetto et al., 2008), Emilia Romagna (Trentini et al., 2010) e Sardegna (Garippa et al., 2016) rispettivamente su 119, 72 e 91 asini.

I risultati ottenuti dimostrano che, in Italia, le endoparassitosi nell'asino sono ampiamente diffuse e questi dati sono in linea con i valori riportati negli studi presenti in bibliografia (Getachew et al., 2010; Zerihun et al., 2011; Moore, 2012; Alemayehu e Etaferahu, 2013; Valdéz-Cruz et al., 2013; Tesfu et al., 2014; Tavassoli et al., 2016; Mohamee et al., 2017).

Il presente studio ha evidenziato negli asini allevati in Italia, una prevalenza predominante degli SI pari all'84,9%; questo risultato dimostra come questi elminti, così come avviene per i cavalli, rappresentino i principali endoparassiti anche nell'asino (Pacifico et al., 2016). Gli esami coprologici hanno evidenziato che il 44,4% (788/1775) degli animali presentavano una FEC < 300 UPG (bassi eliminatori); il 18,1% (321/1775) presentavano una FEC compresa tra 301-600 UPG (medi eliminatori) ed il 37,5% (666/1775) soggetti presentavano una FEC > 600 (alti eliminatori). Da questi risultati si può affermare che a differenza di quanto avviene nei cavalli, in cui le tre categorie di eliminatori (bassi-medi-alti) sono maggiormente distinte tra loro assumendo rispettivamente valori pari al 50-70%, 10-20% e 20-30% della popolazione come riportato da Kaplan e Nielsen (2010), nell'asino questo non si verifica e probabilmente ciò è dovuto alla minore frequenza dei trattamenti antiparassitari in questa specie animale. In Sicilia, Giannetto et al. (2008) in seguito ad esami coprologici effettuati su 119 asini provenienti da 6 aziende, hanno riportato una prevalenza agli SI pari al 77% (92/119). Il 18% degli asini erano bassi eliminatori (22/119) con FEC < 200 UPG; il 34% (41/119) erano medi eliminatori con una FEC con valori compresi tra 200 e 600 UPG ed il 10% (12/119) presentava una FEC con valori compresi tra 600 e 1000 UPG, alti eliminatori. Da notare che il 16% (19/119) presentava una FEC > 1.000 UPG potendo essere considerati altissimi eliminatori. Anche nel presente studio il 20% degli asini ha presentato valori superiori a 1.000 UPG (dati non mostrati in tabella) confermando nella specie asinina una presenza di animali con elevatissima escrezione di uova.

Una maggiore prevalenza di infezione agli SI (93,8% - 68/72 asini) è stata invece riportata in Emilia Romagna (Trentini et al., 2010) ed in Sardegna (98,9% - 90/91 asini) (Garippa et al., 2016). Questi due studi si riferiscono, però, ad asini provenienti da una azienda a conduzione biologica e ad asinelli dell'isola dell'Asinara dove in entrambi i casi i trattamenti antielmintici erano presumibilmente limitati o assenti.

L'esame coproculturale ha evidenziato, in tutte le aziende, la presenza di piccoli strongili (100%); tuttavia, desta notevole interesse anche l'alta percentuale delle strongilosi sostenute da *S. vulgaris* (31%) a testimonianza che, a differenza di quanto avviene nel cavallo, nell'asino questo parassita, pur senza provocare una evidente sintomatologia clinica, è ancora molto presente. È stata inoltre riportata la presenza di L3 appartenenti a *Poteriostomum* spp. (25%), *Triodontophorus* spp. (9%), *S. edentatus* (7%), *S. equinus* (5%). Trentini et al. (2010), in seguito ad esami coproculturali, sebbene abbiano riportato una prevalenza leggermente inferiore di piccoli strongili (93,1%), hanno tuttavia riportato una prevalenza nettamente superiore a *S. vulgaris* (76,4%), probabilmente associata alla conduzione biologica dell'azienda indagata, ma questo dato rappresenta una ulteriore testimonianza che questo parassita è ampiamente diffuso nella popolazione asinina in Italia. Sempre Trentini et al. (2010) hanno inoltre riportato L3 appartenenti a *S. edentatus* (6,9%), *Triodontophorus* spp. (18,1%) e *Trichostrongylus* spp. (12,5%).

Garippa et al. (2016) in Sardegna, negli asini dell'Asinara, hanno riportato la presenza di L3 appartenenti a *Cyathostominae*, grandi strongili e *Trichostrongylus axei* con una prevalenza rispettivamente del 61%, 30% e 9%.

L'analisi dei differenti fattori di rischio ha evidenziato che il genere, la presenza del pascolo e la condivisione del pascolo con i ruminanti, il BCS, l'età, la dimensione dell'azienda ed il numero dei trattamenti non sono fattori di rischio associati all'infezione da parte degli SI; mentre la razza, la condivisione del pascolo con i cavalli e l'origine geografica degli asini rappresentano fattori di rischio associati alla parassitosi sostenuta dagli strongili intestinali ($p < 0.05$).

A differenza di quanto da noi riportato, tuttavia, Trentini et al. (2010) hanno evidenziato una maggiore prevalenza di piccoli strongili e *S. vulgaris* nei soggetti adulti rispetto ai soggetti giovani; inoltre hanno riportato una maggiore presenza di *S. vulgaris* nelle femmine in lattazione. I dati da noi riportati, inoltre si discostano da quanto osservato da Getahun e Kassa (2017) in Etiopia, che hanno evidenziato che l'età degli asini

rappresenta un fattore di rischio associato alle infezioni da strongili intestinali.

I dati ottenuti nel presente studio dimostrano che un BCS scadente non è obbligatoriamente associato alla presenza dei parassiti, così come dimostrato anche da Getachew (2006), Burden et al. (2010), Dibaba et al. (2017).

Gli asini di razza pura hanno dimostrato di essere 1,3 volte maggiormente parassitati rispetto agli incroci (OR = 1,34; $P < 0,001$), questo dato risulta alquanto difficile da spiegare ed ulteriori studi dovranno essere sviluppati per poter confermare una maggiore suscettibilità agli SI negli asini di razza pura rispetto ai meticci probabilmente più rustici.

La condivisione del pascolo con i cavalli sembrerebbe essere un fattore di rischio per la presenza degli SI, infatti, negli asini che condividono il pascolo con i cavalli rispetto a quelli che non lo condividono, la prevalenza delle parassitosi sostenute dagli SI è superiore (OR = 1,35; $P < 0,05$); diversamente avviene per gli asini che condividono il pascolo con i ruminanti i quali rappresentano quindi un fattore di protezione nei confronti delle strongilosi dell'asino, a conferma della azione di diluizione e di "pulizia" dei pascoli da parte di bovini e pecore, pratica che viene considerata anche nelle strategie di controllo non farmacologiche (Matthews e Burden, 2013).

In Sardegna, Garippa et al. (2010) hanno evidenziato che il periodo dell'anno, la distribuzione geografica delle aziende ed il tipo di pascolo rappresentano dei fattori di rischio per l'insorgenza delle parassitosi. L'espulsione delle uova attraverso le feci è risultata 10,887 volte superiore durante l'autunno rispetto all'estate e di 2,865 volte maggiore negli asini che risiedevano nella zona Nord dell'isola rispetto agli altri allevati in altre zone. Questo dato non è confrontabile con i nostri risultati in quanto non è stato possibile associare i prelievi a tutti i periodi dell'anno.

Nel presente studio è emersa una prevalenza piuttosto bassa (3,61%) delle elmintiasi sostenute da *Parascaris* spp., le quali, sono state rinvenute principalmente nei soggetti giovani (< 1 anno di età), e questo è in linea con la tesi di Clayton e Duncan (1979) secondo cui gli ascaridi parassitano gli animali giovani.

I valori di prevalenza ottenuti nel presente studio sono inferiori rispetto a quelli riportati in Sicilia da Giannetto et al. (2008), in Emilia Romagna da Trentini et al. (2010) ed in Sardegna da Garippa et al. (2016) che hanno

riscontrato rispettivamente una prevalenza del 9% (11/119 asini), del 18 (13/72 asini) e del 15,4% (14/91 asini).

La maggior parte degli studi effettuati sulle endoparassitosi negli asini, sono stati condotti in Africa e nello specifico in Etiopia. Numerosi studi hanno riportato che gli asini, in queste regioni, sono fortemente parassitati da *Parascaris* spp; infatti Getachew et al. (2010), Nuraddis et al. (2011), Mezgebu et al. (2013), Zeryhun e Tsegaw et al. (2016), Mohamee et al. (2017) hanno riportato, rispettivamente, una prevalenza del 51%; 52,8%; 42,3%; 41,8% e 44,8%. Queste prevalenze così elevate potrebbero essere associate alle scarse pratiche di controllo delle ascaridiosi nei Paesi africani. Prevalenze inferiori sono state invece riscontrate da Gebreyohans et al. (2017) e Getahun e Kassa (2017) che hanno riportato rispettivamente il 6,4% e l'11,2%.

In Asia un recente studio condotto su 35 asini ha riportato una prevalenza di *Parascaris* spp. pari al 74% (Sathiyanoorthy et al., 2016).

L'analisi dei differenti fattori di rischio ha evidenziato che la razza, la presenza del pascolo e la condivisione del pascolo sia con i ruminanti che con i cavalli ed il numero dei trattamenti antiparassitari nel corso dell'anno non sono fattori di rischio associati all'infezione di *Parascaris* spp.; mentre il genere, l'età, il BCS, l'origine geografica e la dimensione dell'azienda, rappresentano fattori di rischio associati alla parassitosi sostenuta da *Parascaris* spp. ($p < 0,05$).

In accordo con la tesi sostenuta da Reinemeyer e Nielsen (2009), anche a nostro parere, nell'asino, così come avviene nel cavallo, l'età risulta essere un fattore discriminante per quanto riguarda le parassitosi sostenute da *Parascaris* spp. Infatti, i soggetti giovani sono maggiormente parassitati rispetto agli adulti in cui, a partire dai sei mesi di età, si ha lo sviluppo dell'immunità acquisita anche in assenza di precedenti esposizioni. Risultati analoghi sono riportati da Trentini et al. (1992) che hanno riportato una maggiore prevalenza nei soggetti giovani (< 6 mesi) e da Garippa et al. (2016) che, in Sardegna, hanno riscontrato che i soggetti giovani, rispetto agli adulti, sono a maggior rischio (OR = 0,978) di contrarre infezioni parassitarie sostenute da *P. equorum*. Dato sicuramente interessante è che gli stessi autori hanno riportato che nell'asino dell'Asinara, l'albinismo, sembrerebbe essere un fattore di rischio nei confronti di questa parassitosi.

Questi dati concordano con quanto riportato da Zerihun (2008), Nuraddis et al. (2011), Zerihun et al. (2011), Sheferaw e Alemu (2015), Getahun e Kassa (2017) che hanno riportato una maggiore prevalenza di ascaridi in soggetti giovani; tuttavia differiscono da quanto riportato da altri autori che

hanno ritrovato gli ascaridi anche in animali adulti (Ayele et al., 2006; Getachew et al., 2008; Getachew et al., 2009). È da considerare, tuttavia, che l'elevata prevalenza di *Parascaris* spp. nei soggetti adulti è stata riscontrata in Paesi, come l'Etiopia, in cui le pratiche di management degli animali non sono ottimali; ciò comprometterebbe il corretto sviluppo del sistema immunitario degli animali anche nei confronti dei parassiti (Getachew et al., 2010).

Gli asini con uno scarso *body condition score* (BCS < 3) hanno presentato una prevalenza di infezione da parte di *Parascaris* spp., maggiore ($p < 0,05$) rispetto agli animali con BCS > 3; questo potrebbe essere giustificato da uno sviluppo insufficiente dell'immunità acquisita negli animali con scadenti condizioni generali. Risultati analoghi sono stati riportati anche in altri studi (Nuraddis et al., 2011; Getahun e Kassa, 2017). È da considerare, tuttavia, che uno scarso BSC potrebbe essere causato dalla presenza del parassita stesso e per questo motivo non rappresenterebbe un fattore di rischio ma un fattore causale (Alemayehu e Etaferahu, 2013).

Nel presente studio è emersa una prevalenza delle infezioni sostenute da *O. equi* pari al 5,80% (103/1775 asini). Le prevalenze da noi ottenute sono simili a quelle precedentemente riportate in Emilia Romagna (9,72%) (Trentini et al., 2010) mentre sono leggermente superiori rispetto a quelle riportate in Sardegna (2,2%) (Garippa et al., 2016).

I valori da noi ottenuti sono in linea con quelli riportati in altri studi (Alemayehu e Etaferah, 2013; Wako et al., 2016; Getahun e Kassa, 2017).

Dictyocaulus arnfieldi è stato rinvenuto in 122/1775 (6,87%) dei campioni fecali esaminati. I valori di prevalenza da noi ottenuti sono nettamente differenti da quelli riportati da Giannetto et al. (2008) e Garippa et al. (2016) che hanno evidenziato rispettivamente una prevalenza pari al 24% ed al 46,1%. È stato inoltre evidenziato che la presenza nelle feci delle L1 di *D. arnfieldi* era maggiore durante l'autunno rispetto l'estate (OR = 5,577).

Negasa et al. (2017), in uno studio condotto in Etiopia hanno riscontrato *D. arnfieldi* in 57/313 asini (18,2%). Gli stessi autori hanno inoltre dimostrato che la prevalenza delle parassitosi polmonari era strettamente associata ($p < 0,05$) a fattori di rischio quali l'età ed il BCS degli asini, ma anche al periodo dello studio; infatti, animali con età compresa tra gli 8 ed gli 11 anni, ed animali con uno scarso BCS erano maggiormente parassitati rispetto ad animali giovani o con un BCS adeguato.

La bassa prevalenza delle infezioni da cestodi ottenute nel presente studio (1,01%) sono in accordo con quanto riportato da Trawford e Getachew (2008) in uno studio condotto sugli asini del Donkey Sanctuary, UK. In Turchia, Umur e Açıci (2009) hanno riportato una prevalenza del 6,45%. In Africa, e nello specifico in Etiopia, uno studio sierologico-epidemiologico condotto da Getachew et al. (2012) hanno riportato una prevalenza piuttosto alta di *Anaplocephala* spp. in asini da lavoro; questi risultati sono avvalorati da quanto riportato da Ayele et al. (2006), Getachew et al. (2010), Abebew et al. (2011). Prevalenze superiori (15,4%) sono state riportate da Nakayima et al (2017) in Uganda.

La prevalenza delle parassitosi sostenute da *S. westeri* è stata pari allo 0,28% (5/1775) asini; questi valori sono inferiori rispetto a quelli riportati nel Parco Nazionale dell'Asinara (Garippa et al., 2016) in cui è stata riscontrata una prevalenza del 6,6% (6/91 asini). In Turchia ed in Macedonia questa parassitosi è stata riportata rispettivamente con una prevalenza del 73% (Sotiraki et al., 1997) e del 22,6% (Umur e Açıci, 2009). Seppur in linea con quanto riportato in Etiopia da Sheferaw e Alemu (2015) che hanno riscontrato *S. westeri* in 3/283 (1,1%) degli asini esaminati, i nostri valori si discostano notevolmente da quanto riportato, sempre in Etiopia da Abebew et al. (2011) che hanno riportato una prevalenza del 77,8%.

Le analisi coprologiche effettuate nel corso di questa indagine non hanno evidenziato la presenza di *F. hepatica*; di contro in uno studio coprologico condotto presso il Donkey Sanctuary su 735 asini, è stata repertata una positività del 4% principalmente da animali provenienti dal Galles e dall'Irlanda (Matthews e Burden, 2013).

La distomatosi epatica è stata riportata negli asini in differenti paesi, quali l'Etiopia, con valori massimi anche del 50% (Getachew et al., 2010). Elevate prevalenze (16,1%) sono state inoltre riportate in Turchia (Umur e Açıci, 2009).

Il presente studio ha evidenziato una elevata prevalenza delle endoparassitosi negli asini in Italia, principalmente sostenute da strongili intestinali ed in minor misura da *D. arnfieldi*, *O. equi* e *Parascaris* spp.. Nell'asino quindi in base alla intensità delle cariche parassitarie, alla distribuzione delle diverse categorie di UPG e alla composizione dei generi

e delle specie, con una netta presenza di *S. vulgaris*, ci permette di poter definire l'asino come *un cavallo di 30 anni fa* (Veneziano, 2017).

Dalla *questionnaire survey* si evince che, i LM, così come avviene nei cavalli (Allison et al., 2011), anche nell'asino rappresentano le principali molecole utilizzate nel controllo delle endoparassitosi; tuttavia, in questa specie animale, allevata per la produzione di alimenti destinati al consumo umano, queste molecole troverebbero una difficile collocazione a causa della loro escrezione nel latte. A tale proposito sarebbe opportuno individuare molecole da poter somministrare agli asini in lattazione per poter meglio gestire le parassitosi (Veneziano et al., 2012; Gokbulut et al., 2013, 2014, 2016).

Bibliografia

- Abebew, D., Endebu, B., Gizachew, A. (2011). Status of parasitism In donkeys of project and control areas in central region of Ethiopia: a comparative study. *Ethiopian Veterinary Journal*, 15(2): 45-55.
- Alemayehu, R. e Etaferahu, Y. (2013). Gastrointestinal parasites of equine in South Wollo Zone, North Eastern Ethiopia. *Global Veterinaria*, 11(6): 824-830.
- Allison, K., Taylor, N.M., Wilsmore, A.J., Garforth, C. (2011). Equine anthelmintics: survey of the patterns use, beliefs and attitudes among horse owners in the UK. *Veterinary Record*, 168: 483-487.
- Ayele, G., Feseha, G., Bojia, E., Joe, A. (2006). Prevalence of gastro-intestinal parasites of donkeys in Dudga Bora District, Ethiopia. *Livestock Research for Rural Development*, 18: 2-6.
- Bevilaqua, C.M.L., de Rodrigues, L.M., Concordet, D. (1993). Identification of infective larvae of some common nematode strongylids of horses. *Revue de Medicine Veterinaire*, 144(12): 898-995.
- Burden, F.A., Du Toit, N., Hernandex-Gil, M., Prado-Ortiz, M., Trawford, A.F. (2010). Selected health and management issues facing working donkeys presented for veterinary treatment in the rural Mexico: some possible risk factors and potential intervention strategies. *Tropical Animal Health and Production*, 42: 597-605.
- Clayton, H.M. e Duncan, J.L. (1979). The development of immunity to *Parascaris equorum* infection in the foal. *Research in Veterinary Science*, 26: 383-384.
- Cringoli G, Rinaldi L, Veneziano V, Capelli G, Malone JB. (2002). A cross-sectional coprological survey of liver flukes in cattle and sheep from an area of the southern Italian Apennines. *Veterinary Parasitology* 108 (2):137-143.
- Cringoli G., Rinaldi L., Venenziano V., Capelli G., Scala A., (2004) The influence of flotation solution, sample dilution and the choice of McMaster slide area (volume) on the reliability of the McMaster technique in estimating the faecal egg counts of gastrointestinal strongyles and *Dicrocoelium dendriticum* in sheep. *Veterinary Parasitology*, 123 (1/2), 121-131.
- Dibaba, M.D., Getachew, A.M., Zerihun, A., Alemayu, F., Manyahilishal, E., Seyoum, F., Lemessa, G., Burden, F. (2017). Seasonal variation of strongylosis in working donkeys of Ethiopia: a cross-sectional study. *Parasitology Research*, 116(7): 2009-2015.
- Garippa, G., Elisabetta, P., Sanna Passino, E., Pau, S., Columbano, N., Scanu, A., Caggiu, S., Deiana, R., Melosu, V., Manfredi, M.T. (2016). Risk factors of gastrointestinal parasites lungworms ticks and lice in donkeys in the Asinara National Park (Sardinia – Italy). In: Abstract Book, LXX Convegno Sisvet, pp. 258-259.
- Gebreyohans, A., Abrhaley, A., Kebede, E. (2017). Prevalence of gastrointestinal helminthes of donkey in and around Mekelle. *Nature and Science*, 15(1): 42-57.
- Genchi, M., Traldi, G., Genchi, C. (2014). Manuale di Parassitologia Veterinaria. Casa Editrice Ambrosiana.
- Getachew, M.A. (2006). Endoparasites of working donkeys in Ethiopia: epidemiological study and mathematical modelling. In: Phd Thesis, University of Glasgow, Scotland.

- Getachew, M.A., Innocent, T.G., Trawford, F.A., Feseha, G., Reid, S.W.J., Love, S. (2008). Equine parascariosis under the tropical weather conditions of Ethiopia: a coprological and postmortem study. *Veterinary Record*, 162: 177-180.
- Getachew, M.A., Trawford, A., Feseha, G., Reid, S.W.J. (2009). Gastrointestinal parasites of working donkeys of Ethiopia. *Tropical Animal Health and Production*, DOI 10.1007/s11250-009-9381-0.
- Getachew, M.A., Trawford, A., Feseha G., Reid, S.W.J. (2010). Gastrointestinal parasites of working donkeys of Ethiopia. *Tropical Animal Health and Production*, 42: 27-33.
- Getachew, M.A., Innocent, G., Proudman, C.J., Trawford, A., Feseha, G., Reid, S.W.J., Faith, B., Love, S. (2012). Equine cestoidosis: a sero-epidemiological study of *Anoplocephala perfoliata* infection in Ethiopia. *Veterinary Research Communication*, 36(2): 93-98.
- Getahun, T.K. e Kassa, T.Z. (2017). Prevalence and species of major gastrointestinal parasites of donkeys in Tenta Woreda, Amhara Regional State, Ethiopia. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health*, 9(2): 23-31.
- Giannetto S., Poglayen G., Brianti E. (2008). I parassiti dell'asina dall'immagine all'azione. In: L'asino all'attenzione della comunità scientifica e del territorio. A cura di Conte F., Chiriotti Ed. 32-36.
- Gokbulut, C., Naturali, S., Rufrano, D., Anastasio, A., Yalinkilinc, H.S., Veneziano, V. (2013). Plasma disposition and milk excretion of eprinomectin following pour-on administration in lactating donkeys. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 36(3): 302-305.
- Gokbulut, C., Aksit, D., Smaldone, G., Mariani, U., Veneziano, V. (2014). Plasma pharmacokinetics, faecal excretion and efficacy of pyrantel pamoate paste and granule formulations following per os administration in donkeys naturally infected with intestinal strongylidae. *Veterinary Parasitology*, 205(1-2): 186-192.
- Gokbulut, C., Aksit, D., Santoro, M., Roncoroni, C., Mariani, U., Buono, F., Rufrano, D., Fagiolo, A., Veneziano, V. (2016). Plasma disposition, milk excretion and parasitological efficacy of mebendazole in donkeys naturally infected by Cyathostominae. *Veterinary Parasitology*, 217: 95-100.
- Kaplan, R.M. e Nielse, M.K. (2010). An evidence-based approach to equine parasite control: It ain't the 60s anymore. *Equine Veterinary Education*, 22: 306-316.
- M.A.F.F. (1984). Manual of Veterinary Investigation Laboratory Techniques. Reference book, pp. 390.
- Matthews, J.B. e Burden, F. (2013). Common helminth infections of donkeys and their control in temperate regione. *Equine Veterinary Education*, 25(9): 461-467.
- Mezgebu, T, Tafess, K, Tamiru, F. (2013). Prevalence of gastrointestinal parasites of horses and donkeys in and around Gondar Town, Ethiopia. *Open Journal of Veterinary Medicine*, 3: 267-272.
- Mohamee, A., Hailemariam, K., Yimer, M. (2017). Major gastrointestinal parasites of donkey in and around Jigjiga, Somali Region, Ethiopia. *Advances in Biological Research*, 11(3): 144-149.
- Moore, A.J. (2012). Assessment of Sustainable Methods of Cyathostomin Control at The Donkey Sanctuary Devon.
- Nakayima, J., Kabasa, W., Aleper, D., Okidi, D. (2017). Prevalence of endo-parasites in donkeys and camels in Karamoja sub-region, North-eastern Uganda. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health*, 9(1): 11-15.

- Negasa, T., Dilbato, T., Gudeta, D. (2017). Cross-sectional study on equine lung worm and associated risk factor in Ambo District, Oromia Region, Ethiopia. *International Journal of Research Granthaalayah*, 5(5): 312-318.
- Nuraddis, I., Tilahun, B., Benti, D., Tadele, T. (2011). Survey of prevalence of helminth parasites of donkeys in and Atund Hawassa Town, Southern Ethiopia. *Global Veterinaria*, 6(3): 223-227.
- Pacifico, L., Buono, F., Neola, B., Piantedosi, D., Caracciolo di Brienza, V., Brignolo, A., Roncoroni, C., Fagiolo, A., Veneziano, V. (2016). A coprological survey on the principal endoparasitic infections in horse in Italy. In: Poster, XXII Congresso Multisala SIVE - Milano, 14-15 ottobre 2016.
- Proudman, C.J. e Edwards, G.B. (1992). Validation of a centrifugation/flotation technique for the diagnosis of equine cestodiasis. *Veterinary Record*, 131: 71-72.
- Reinemeyer, C.R. e Nielsen, M.K. (2009). Parasitism and colic. *Veterinary Clinics of North America: Veterinary Practice*, 25: 233-245.
- Sathiyamoorthy, A., Vivek, S., Selvaraju, G., Palanivel, K.M. (2016). Study of endoparasitic infection in donkeys – A report. *International Journal of Science, Environment and Technology*, 5(6): 4545-4549.
- Sheferaw, D. e Alemu, M. (2015). Epidemiological study of gastrointestinal helminths of equines in Damot-Gale district, Wolaita zone, Ethiopia. *Journal of Parasitic diseases*, 39(2): 315-320.
- Sotiraki, S., Badouvas, A., Himonas, C. (1997). A survey on the prevalence of internal parasites of equines in Macedonia and Thessalia-Greece. *Journal of Equine Veterinary Science*, 17: 550-552.
- Svendsen, E.D. (1997). The professional handbook of the donkey. 3rd ed., Whittet Books, London.
- Tavassoli, M., Arjmand, J., Hajipour, N. (2016). A survey on the prevalence of strongyles species in working donkeys in North-West of Iran. *Journal of Parasitic Diseases*, 40(4): 1210-1212.
- Tesfu, N., Asrde, B., Abebe, R., Kasaye, S. (2014). Prevalence and risk factors of gastrointestinal nematode parasites of horse and donkeys in Hawassa Town, Ethiopia. *Journal Veterinary Science & Technology*, doi:10.4172/2157-7579.1000210.
- Thrusfield, M. (2005). Veterinary epidemiology. Blackwell Science.
- Trawford, A. e Getachew, M. (2008). Parasites. In: Dunca, J. e Hadrill, D. (eds). The Professional Handbook of the Donkey (4th ed.). Whittet Books Limited. South House, Yatesbury, Wiltshire, UK, 82-101.
- Trentini A., Stancampiano L., Usai F., Micagni G., Poglayan G. (2010). Donkey endoparasites in an organic farm. *Parassitologia*, 52: 336.
- Umur, Ş. e Açıci, M. (2009). A survey on helminth infections of equines in the Central Black Sea region, Turkey. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 33(5): 373-378.
- Valdéz-Cruz, M.P., Hernández-Gil, M., Galindo-Rodríguez, L., Alonso-Díaz, M.A. (2013). Gastrointestinal nematode burden in working equids from humid tropical areas of central Veracruz, Mexico, and its relationship with body condition and haematological values. *Tropical Animal Health and Production*, 2: 603-607.

- Veneziano, V., Neglia, G., Galietti, A., Rufrano, D., Bassini, A., Mariani, U., Gokbulut, C. (2012). Efficacy of alphacypermetrin pour-on against natural *Wernerckiella equi* infestation on donkeys (*Equus asinus*). *Parasitology Research*, 111(3): 967-973.
- Veneziano, V. e Veronesi, F. (2015). Le più comuni parassitosi dell'asino in Italia: epidemiologia e controllo. In: Abstract Book, XXI Congresso SIVE, pp. 200-206.
- Veneziano, V. (2017). Comunicazione personale in 71° *Convegno SISVET – 28 giugno – 1 luglio*. Napoli.
- Wako, G., Buro, B., Mohammed, J., Ousman, A., Ebrahim, K., Hasen, M., Abdurahaman, M. (2016). Prevalence of major gastrointestinal parasites in donkeys in Dodola District, West Arsi, Oromia Regional State, Ethiopia. *World Journal of Agricultural Sciences*, 12(2): 119-124.
- Zajac, A.M. e Conboy, G.A. (2011). *Veterinary Clinical Parasitology* (8th ed.) Wiley-Blackwell.
- Zerihun, M. (2008). The status of strongyle and *Parascaris* population in working donkeys in Central Ethiopia. DVM Thesis, FVM, AUU, Debre Zeit, Ethiopia.
- Zerihun, A., Bersissa, K., Bojia, E., Ayele, G., Tesfaye, M., Etana, D. (2011). Endoparasites of Donkeys in Sululta and Gefersa Districts of Central Oromia, Ethiopia. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 10(14): 1850-1854.
- Zeryhun, T. e Tsegaw, F. (2016). Endoparasites of donkeys in Dessie and its surroundings, Northeastern Ethiopia. *Ethiopian Veterinary Journal*, 20(1): 79-90.

Capitolo 6

Cinetica plasmatica, escrezione nel latt ed efficacia
parassitologica del mebendazolo in asini naturalmente infettati
da Cyathostominae

6.1 Introduzione

Le molecole attualmente registrate per l'utilizzo negli asini sono piuttosto limitate (Lizzaraga et al., 2004) e le informazioni disponibili circa la farmacocinetica dei farmaci antiparassitari tra cui i benzimidazolici (Gokbulut et al., 2006), gli endectociti (Gokbulut et al., 2005, 2011, 2013) e le tetraidropirimidine (Gokbulut et al., 2014) sono piuttosto scarse.

La mancanza di molecole regolarmente registrate per gli asini fa sì, che nella pratica comune, i farmaci registrati per i cavalli o per i ruminati, compresi quelli ad azione antiparassitaria, siano utilizzati per trattamenti terapeutici anche nell'asino (Veneziano et al., 2011).

Tra i farmaci autorizzati per il trattamento delle parassitosi asinine si annovera il mebendazolo e per tale motivo, nel presente studio, sono stati valutati la disposizione plasmatica, l'escrezione nel latte, l'efficacia antiparassitaria e l'ERP di questa molecola, somministrata *per os*, al dosaggio di 10 mg/kg e di 20 mg/kg, in asini naturalmente infettati da Cyathostominae, seguendo le linee guida proposte dalla *American Association of Equine Practitioners* (AAEP) attraverso il *faecal egg count reduction test* (Nielsen et al., 2013).

6.2 Il mebendazolo

Il mebendazolo (MBZ) (figura 6.1) appartiene alla classe farmacologica dei BZ ed è utilizzato da più di 20 anni sia in medicina veterinaria che in medicina umana per il controllo di numerose malattie parassitarie tra cui quelle sostenute dai nematodi intestinali.

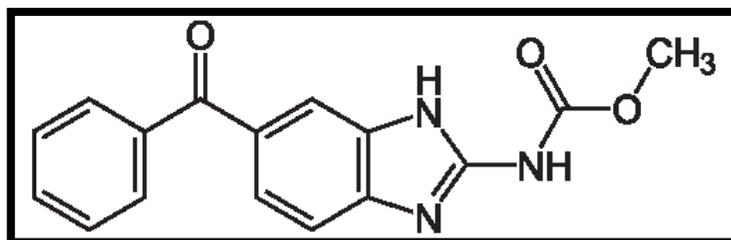


Fig. 6.1 Formula di struttura del Mebendazolo

Il dosaggio raccomandato varia dai 5 mg/kg ai 50 mg/kg a seconda della specie ospite e dell'infezione parassitaria. Nei cavalli il dosaggio raccomandato è di 5-10 mg/kg *per os* (McKellar e Scott, 1990).

Nell'asino, somministrato a 20 mg/kg per 5 giorni consecutivi è efficace nei confronti di *Dictyocaulus arnfieldi* (Clayton e Neave, 1979).

Così come altri bezimidazolici metilcarbamati (albendazolo e febendazolo) la scarsa solubilità del MBZ ne limita il suo assorbimento a livello sistemico (McKellar e Scott, 1990). Il MBZ viene metabolizzato principalmente a livello epatico (Gotshall et al., 1990). Nell'uomo, così come nelle altre specie animali, i principali metaboliti prodotti derivano dalla riduzione del cheto-gruppo ad una funzione ossidrilica e alla decarbossilazione dell'anello imidazolico (Dollery 1999; EMEA, 1999).

Quantità piuttosto limitate di questi metaboliti si riscontrano nelle urine dove, invece, si rinvenivano principalmente metaboliti coniugati non identificati privi di attività antielmintica (Dollery, 1999).

Il MBZ è una molecola generalmente ben tollerata ed è registrato in Italia per il cavallo in formulazione pasta.

6.3 Materiali e metodi

La prova è stata condotta in una azienda asinina localizzata in provincia di Salerno, in regione Campania (Sud Italia).

Al momento della prova nell'azienda erano presenti 68 asini di razza Ragusana e meticcii che da precedenti controlli parassitologici risultavano essere naturalmente parassitati da strongili intestinali. Gli asini erano allevati al pascolo permanente stanziale con rientro serale in un recinto comune.

Al fine di valutare la gestione aziendale, nell'azienda è stato compilato un questionario riportante le seguenti informazioni: nome e microchip dell'asino, genere, età, BCS, peso, eventuale promiscuità con altri animali sia da compagnia che da reddito (con particolare attenzione alla presenza di cavalli e/o muli), il tipo di alimentazione, il numero dei trattamenti antiparassitari effettuati nell'arco di un anno e le molecole utilizzate.

6.3.1 Animali oggetto di studio

Nel corso di questa prova sono state utilizzate diciotto asine meticcie, in lattazione, con una età media (\pm DS) di 10 ± 4 anni, con un peso medio (\pm DS) di 294 ± 49 kg. Il peso di ciascun animale è stato valutato, un giorno prima dell'inizio della prova, utilizzando il nomogramma proposto dal *The*

Donkey Sanctuary, con una approssimazione di 10 kg, al fine di eseguire un trattamento antiparassitario a dose ottimale.

Le asine venivano munte una volta al giorno e la produzione di latte durante lo studio variava dai 1500 ai 1800 ml/giorno.

Gli animali oggetto della prova sono stati identificati applicando una targhetta numerata attaccata alla capezza (figura 6.2).



Fig. 6.2 Identificazione degli animali mediante targhetta numerata (Foto F. Buono)

Durante l'intero periodo della prova, gli asini sono stati confinati in un recinto comune con pascolo permanente; fieno e concentrati (orzo, crusca, barbarbietole, avena, carrube) sono stati somministrati come alimento complementare. L'acqua è stata somministrata *ad libitum* per tutta la durata della prova (figura 6.3).

Tutti gli asini erano caratterizzati da un'anamnesi di pascolamento su terreni contaminati da nematodi intestinali e non hanno ricevuto un trattamento antiparassitario nei sei mesi antecedenti l'inizio della prova.



Fig. 6.3 Animali oggetto della prova (Foto F. Buono)

Gli esami coprologici (*Faecal Egg Count* individuali e coproculture di gruppo) effettuati prima dell'inizio della prova (giorni -14 e -3) hanno mostrato una FEC individuale >500 UPG ed un'alta prevalenza di *Cyathostominae* in tutti gli asini oggetto di studio.

La presente prova sperimentale è stata approvata dalla Commissione Etica Animale dell'Università degli Studi di Napoli – Federico II.

6.3.2 Gruppi sperimentali

Al giorno -3, gli animali oggetto di studio ($n = 18$) presentavano una FEC media di 1520 ± 522 UPG. Gli asini sono stati dapprima ordinati, sulla base della loro FEC, dai meno parassitati ai più parassitati, e successivamente ripartiti *at random* in tre gruppi sperimentali, ognuno composto da 6 soggetti, omogenei per età, peso e UPG. Si sono così costituiti i seguenti gruppi di trattamento:

- ✓ **GRUPPO MBZ 1** – trattato con mebendazolo pasta allo stesso dosaggio utilizzato per i cavalli
- ✓ **GRUPPO MBZ 2** – trattato con mebendazolo pasta al doppio del dosaggio utilizzato per i cavalli
- ✓ **GRUPPO C** – gruppo controllo, non sottoposto a trattamento antiparassitario

I tre gruppi sperimentali, per tutto il periodo di tempo in cui si è svolta la prova sperimentale, sono stati tenuti insieme nelle medesime condizioni. In particolare, hanno condiviso la stessa stalla comune al coperto con accesso al pascolo in un paddock esterno e non hanno subito variazioni nell'alimentazione dal giorno -1 fino alla fine della prova (giorno 56). I restanti asini dell'azienda, esclusi dalla prova, sono stati tenuti al pascolo in un altro recinto.

6.3.3 Trattamenti antiparassitari

Il giorno del trattamento (giorno 0), formulazioni di MBZ pasta, commercializzate per il trattamento delle endoparassitosi negli equini (TelminTM, 20%, Janssen, Italy) e approvate per l'utilizzo nei cavalli, sono state somministrate agli asini *per os* sia al dosaggio utilizzato per i cavalli, 10 mg/kg p.v. (MBZ 1), che al doppio del dosaggio utilizzato per i cavalli, 20 mg/kg p.v. (MBZ 2). Gli asini appartenenti ai due gruppi di trattamento hanno ricevuto una unica somministrazione di farmaco antiparassitario. Gli asini appartenenti al GRUPPO C, non hanno ricevuto trattamenti antiparassitari e hanno così costituito il gruppo controllo ricevendo *per os aqua fontis*.

Tutti gli animali sottoposti al trattamento antiparassitario sono stati tenuti sotto osservazione, per valutare l'eventuale insorgenza di reazioni indesiderate, per l'intera giornata del trattamento (giorno 0) e poi settimanalmente sino alla fine della prova.

6.3.4 Procedure di campionamento

I campioni di sangue (10 ml) sono stati ottenuti attraverso prelievo dalla giugulare in provette con eparina prima della somministrazione del

farmaco e successivamente a 1, 2, 4, 8, 12, 16, 24, 30, 36, 48, 56, 72, 96 e 120 ore dopo il trattamento.

Da ogni asina sono stati inoltre prelevati campioni di latte prima della somministrazione del farmaco antiparassitario e successivamente a 8, 12, 24, 36, 48, 72, 96 e 120 ore dopo post trattamento al fine di determinare l'escrezione del farmaco nel latte (figura 6.4).



Fig. 6.4 Prelievo dei campioni di latte (Foto F. Buono)

I campioni di sangue sono stati centrifugati a 3000 giri al minuto (RPM) per 30 minuti ed il plasma ottenuto è stato successivamente trasferito in criogeni. Tutti i campioni di plasma e di sangue sono stati conservati ad una temperatura di -20°C fino alla determinazione della concentrazione del farmaco.

I campioni di feci sono stati prelevati direttamente dall'ampolla rettale, o quando questo non è stato possibile, sono stati prelevati campioni di feci appena rilasciate direttamente da terra. I campioni di feci sono stati

conservati ad una temperatura di refrigerazione (4°C) ed analizzati, al fine di determinare la FEC per ogni singolo asino, entro 12 ore dal prelievo. La FEC è stata determinata prima dell'inizio della prova (giorno -3) e successivamente alla somministrazione del farmaco nei giorni 7, 14, 21, 28, 35, 42 e 56 (Nielsen et al., 2010).

6.3.5 Procedure analitiche

Una soluzione base (100 µg/ml) di MBZ standard (Sigma, St. Louis, MO, USA) è stata preparata utilizzando acetonitrile (Sigma, St. Louis, MO, USA) come solvente. Questa soluzione base è stata diluita al fine di ottenere soluzioni pari a 0,01 – 0,05 – 0,1 – 0,5 – 1 – 5 µg/ml di soluzione standard per il plasma e per il latte per la calibrazione delle curve standard e sono state aggiunte al plasma ed al latte privi di farmaco al fine di determinare il recupero.

La concentrazione di MBZ nel plasma e nel latte è stata calcolata attraverso HPLC (*high performance liquid chromatography*) con rilevatori di matrici fotodiodiche seguendo la procedura di estrazione liquido-liquido descritta da Dawson et al. (1982).

In sintesi, campioni di plasma o di latte (1 ml) privi di farmaco sono stati miscelati con la soluzione standard al fine di ottenere le seguenti concentrazioni finali: 0,005 – 0,01 – 0,05 – 0,1 e 0,5 µg/ml. L'idrossido di ammonio (100 L, 0,1 N, pH 10) è stato aggiunto in provette in vetro da 10 ml contenenti 1 ml di campioni sperimentali di plasma o di latte; dopo aver miscelato per 15 secondi, sono stati aggiunti 6 ml di etere dietilico. Le provette sono state poi lentamente agitate attraverso un miscelatore rotativo per 10 minuti. In seguito ad una centrifugazione a 3000 RPM x 10 minuti, lo strato di etere dietilico ottenuto (5 ml) è stato trasferito in un cilindro in vetro da 10 ml con pareti sottili e successivamente concentrato a secco a 40°C attraverso l'utilizzo di un concentratore di campioni (Maxy-dry plus, Heto Lab. Equipment, Denmark). Il residuo secco ottenuto è stato successivamente risospeso in 250 µL di dimetilsolfossido (DMSO). In seguito le provette sono state immerse in un sistema ad ultrasuoni ed infine 100 µL di questa soluzione sono stati alloggiati nel sistema cromatografico. La fase mobile era costituita da acetonitrile ed un *buffer* acquoso di fosfato di ammonio 0,05 molare (50:50 v/v) ed è stata erogata (1100 Series QuatPump, Agilent, Waldron, Germany) con una portata di 1 ml/min. L'analisi delle molecole è stata effettuata utilizzando una colonna

analitica nucleosidica C₁₈ (Luna, µm, 150 mm x 4,6 mm, Phenomenex, Macclesfield, Cheshire, UK) con una colonna di protezione nucleosilica C₁₈. La rilevazione dei fotiodi (1100 Series, Agilent, Waldron, Germani) è stata effettuata ad una lunghezza d'onda di 254 nm.

6.3.6 Validazione della metodica analitica

Il metodo analitico utilizzato per la determinazione del MBZ nel plasma e nel latte è stato validato prima dell'inizio della prova. Il grafico di calibrazione del MBZ nel plasma e nel latte, nell'intervallo di 0,005-0,5 µg/ml, è stato allestito utilizzando campioni di plasma e di latte privi di farmaci prelevati dagli asini.

L'analita è stato identificato attraverso i tempi di ritenzione della soluzione base standard. Le concentrazioni della molecola oggetto di studio sono state misurate confrontando le aree di picco ottenute dai campioni di plasma e di latte con le aree di picco ottenute dalla soluzione standard in acetonitrile. La precisione delle procedure di estrazione e di cromatografia sono state valutate mediante la processazione di repliche di aliquote di plasma e di latte contenenti concentrazioni note di farmaco nei differenti giorni.

6.3.7 Analisi parassitologiche: valutazione dell'efficacia antielmintica ed egg reappearance period (ERP)

Nel corso di questa indagine sono stati effettuati esami coprologici individuali quali-quantitativi, ai giorni -3, 7, 14, 21, 28, 42, 49 e 56 al fine di determinare la FEC di ogni singolo animale.

La tecnica adoperata è stata il *Special modification of McMaster method* avente un limite di sensibilità analitica di 10 UPG, utilizzando una soluzione flottante a base di saccarosio con un peso specifico di 1.250 (Reinemeyer e Nielsen 2013; Lester e Matthews, 2014). La conta delle uova è stata effettuata in due camere di lettura ed il numero delle UPG è stato ricavato sommando le uova contate nelle due camere e moltiplicato il risultato per 10.

Per ogni giorno, campioni di feci individuali sono stati mescolati con acqua e vermiculite e incubati, in appositi contenitori, a 27°C per 7-10 giorni al fine di consentire lo sviluppo e la successiva identificazione delle L3. Solo prima dell'inizio della prova (giorni -14 e -3) sono state effettuate

coproculture di gruppo. Le larve di terzo stadio sono state raccolte attraverso l'apparato di Baermann e poi identificate utilizzando le chiavi morfologiche proposte dal MAFF (1986). Nel caso in cui le coproculture contenevano meno di 100 larve queste venivano tutte identificate; viceversa, se conteneva più di 100 larve ne venivano contate ed identificate 100.

Al fine di determinare l'efficacia del MBZ verso i CY, nei giorni 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 e 56 è stata calcolata la media aritmetica delle UPG per ogni gruppo di trattamento seguendo le linee guida proposte dalla WAAP (Coles et al., 1992, 2006). Per ogni gruppo di trattamento (MBZ 1 e MBZ 2) la percentuale di efficacia è stata calcolata in termini di *Faecal Egg Count Reduction* (FECR) in base alla formula seguente:

$$Efficacia (\%) = \frac{\text{media UPG gruppo controllo} - \text{media UPG gruppo trattamento}}{\text{media UPG gruppo controllo}} \times 100$$

L'efficacia farmacologica, in accordo con quanto riportato da Kaplan e Nielsen (2010) è stata valutata, per i BZ con un valore di FECR > 90%. Inoltre, è stato calcolato un intervallo di confidenza al 95% al fine di ottenere una maggiore accuratezza dei risultati (Vidyashankar et al., 2007): un intervallo di confidenza inferiore all'80% è stato scelto per classificare i trattamenti antiparassitari resistenti al MBZ.

L'egg reappearance period (ERP), inteso come l'intervallo di tempo (espresso in settimane) in cui la percentuale di riduzione del valore medio di FEC per un determinato gruppo di trattamento si ritrova al di sotto del valore cutoff dell'80%, è stato calcolato in accordo con l'*American Association of Equine Practitioners (AAEP) Parasite Control Guidelines* (Nielsen et al., 2013). Nella tabella seguente (tabella 6.1) sono schematizzati i valori di ERP così come indicati dalla AAEP:

Tab. 6.1 *Cyathostominae* egg reappearance period

Antelmintico	ERP quando il farmaco è efficace	ERP quando il farmaco è stato introdotto per la prima volta	ERP cutoff value
BZ	4-5 settimane	6 settimane	80%
PYR	4-5 settimane	5-6 settimane	80%
IVM	6-8 settimane	9-13 settimane	90%
MOX	10-12 settimane	16-22 settimana	90%

Modificato da Nielsen et al. (2013)

Il calcolo del valore di cut-off dell'ERP, è dato, per ciascuna classe farmacologica, approssimativamente con il 10% in meno del valore dell'efficacia.

I BZ presentano il più breve periodo di soppressione delle uova nelle feci e così come indicato da Nielsen et al. (2013) il valore atteso varia dai 28 ai 35 giorni (4-5 settimane).

6.3.8 Farmacocinetica ed analisi statistica dei dati

La concentrazione plasmatica vs la curva temporale è stata calcolata dopo ogni singolo trattamento antiparassitario in ciascun animale, ed è stata ottenuta attraverso l'utilizzo del software *WinNonlin* (Versione 5.2, Pharsight Corporation, Mountain View, CA, USA). I parametri farmacocinetici per ogni animale sono stati analizzati utilizzando un modello di analisi non compartimentale per la somministrazione *per os*. La concentrazione plasmatica massima (C_{max}) ed il tempo impiegato per raggiungere la concentrazione massima (t_{max}) sono stati ottenuti analizzando la curva tempo-concentrazione del farmaco in ogni singolo animale. La regola del trapezio è stata utilizzata per calcolare l'area al di sotto della curva plasmatica tempo-concentrazione (AUC). Il tempo di permanenza medio è stato calcolato sempre utilizzando la regola del trapezio con estrapolazione infinita. Le stesse formule sono state utilizzate al fine di determinare la farmacocinetica del MBZ nel latte.

I parametri farmacocinetici sono stati riportati come media±deviazione standard e quelli normalmente distribuiti sono stati analizzati attraverso analisi univariata (ANOVA). Tutte le analisi statistiche sono state effettuate utilizzando MINITAB per Windows (versione 12.1, Minitab Inc., State College, PA, USA). I valori medi sono stati considerati statisticamente significativi con $P < 0,05$.

Al fine di confrontare l'efficacia antiparassitaria in entrambi i dosaggi del MBZ, è stata effettuata un'analisi statistica sui valori medi di UPG utilizzando il test parametrico *T-test* comparando la differenza fra i due gruppi di trattamento a $P < 0,01$; valori di $P < 0,01$ sono stati considerati statisticamente significativi.

6.4 Risultati

6.4.1 Parametri farmacocinetici

Durante le prime ore dopo il trattamento e nel prosieguo dello studio nessun effetto indesiderato è stato osservato negli animali oggetto di studio ad entrambi i dosaggi.

Le procedure analitiche e le analisi HPLC del MBZ sono state validate.

La regressione lineare per il MBZ nell'intervallo di 0,005-0,5 µg/ml hanno mostrato un coefficiente di correlazione pari a 0,9987.

I tempi di ritrovamento del MBZ nel plasma e nel sangue sono stati rispettivamente dell'88,87%±4,37 e 75,33%±5,32.

Il limite di detezione della metodica analitica è stato di 0,01 µg/ml; il limite di quantificazione è stato di 0,005 µg/ml per il plasma ed il sangue.

La precisione della tecnica analitica (media±DS) ha presentato un coefficiente di variazione del 6,11%±2,22 e rispettivamente del 4,91%±3,12 e 5,84%±3,65 rispettivamente per il plasma e per il latte.

I parametri farmacocinetici del MBZ nel plasma e nel latte in seguito a somministrazione *per os* al dosaggio di 10 mg/kg e di 20 mg/kg sono riassunti nella tabella seguente (tabella 6.2).

Tab. 6.2 Media (±DS) dei parametri farmacocinetici del MBZ nel plasma e nel latte in seguito a somministrazione *per os* agli asini al dosaggio di 10 mg/kg e 20 mg/kg

Parametro	Plasma (10 mg/kg)	Plasma (20 mg/kg)	Latte (10 mg/kg)	Latte (20 mg/kg)
t _{1/2λz} (h)	11,97±4,38	13,13±3,85	-	8,40±3,54
t _{max} (h)	7,33±3,93	8,00±0,00	-	10,66±3,29
C _{max} (µg/ml)	0,04±0,01	0,07±0,01	-	0,01±0,00
AUC _{0-∞} (µg.h/ml)	0,78±0,35	1,42±0,20	-	0,29±0,04
AUMC _{0-∞} (µg.h ² /ml)	19,49±7,86	33,78±10,38	-	7,08±0,90
MRT _{0-∞} : (h)	20,34±7,59	23,43±5,55	-	17,63±8,74
AUC _{latte} /AUC _{plasma}	-	-	-	0,18±0,02
C _{max-latte} /C _{max-plasma}	-	-	-	0,20±0,03

C_{max}: picco della concentrazione plasmatica; t_{max}: tempo impiegato al raggiungimento del picco plasmatico; AUC_{0-∞}: area al di sotto (momento zero) della curva dal tempo 0 a infinito; AUMC_{0-∞}: area al di sotto della curva dal tempo 0 ad infinito; MRT_{0-∞}: tempo di persistenza medio; t_{1/2λz}: tempo di dimezzamento

La concentrazione plasmatica media e la concentrazione media nel latte vs la curva temporale sono rappresentate nel grafico seguente (grafico 6.1).

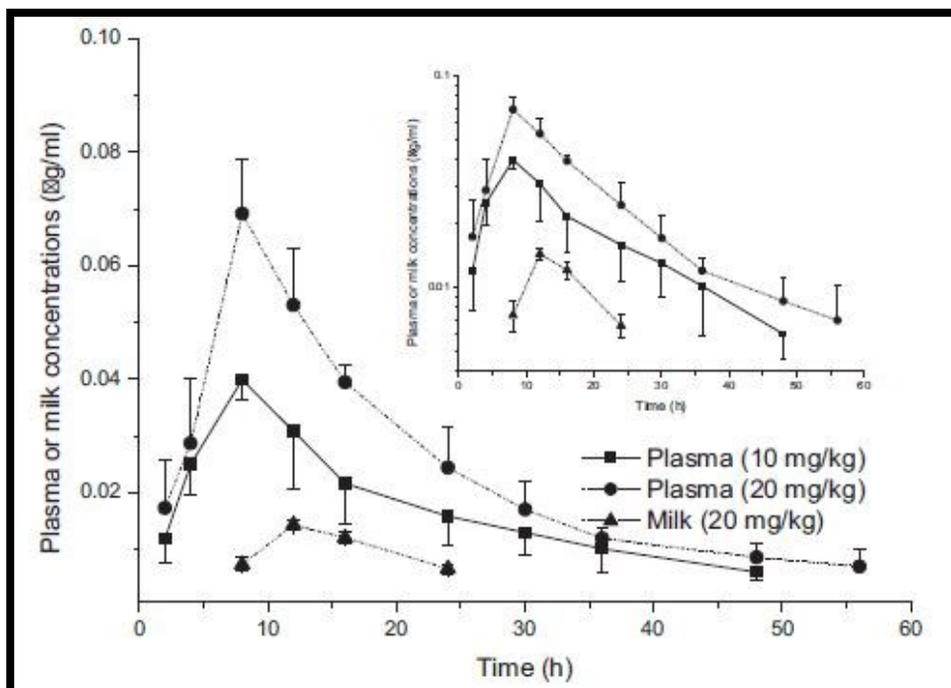


Grafico 6.1 Media (\pm DS) della concentrazione nel plasma e nel latte ($\mu\text{g/g}$) vs curva temporale del MBZ in seguito a somministrazione per os al dosaggio di 10 mg/kg e 20 mg/kg.

Nell'asino, la disposizione plasmatica dose-dipendente del MBZ è stata osservata all'aumentare del dosaggio (10 mg/kg vs 20 mg/kg). Il MBZ ha raggiunto il picco massimo nel plasma (C_{max} : 0,04 e 0,07 $\mu\text{g/ml}$) a 7,33 e 8,00 ore rispettivamente al dosaggio di 10 mg/kg e 20 mg/kg di peso vivo. Il MBZ non è stato rinvenuto in nessun campione di latte in seguito a somministrazione per os al dosaggio di 10 mg/kg peso vivo. Tuttavia ha raggiunto una concentrazione di 0,01 $\mu\text{g/ml}$ a 10,66 ore e il rapporto $\text{AUC}_{\text{latte}}/\text{AUC}_{\text{plasma}}$ è stato di 0,18 al dosaggio di 20 mg/kg di peso vivo.

6.4.2 Quadro parassitologico

Gli esami parassitologici effettuati prima del trattamento (giorno -3), nei tre gruppi sperimentali, hanno evidenziato un valore medio di UPG pari a 1347, 1680 e 1533 rispettivamente nel gruppo controllo, nel gruppo MBZ

1 e nel gruppo MBZ 2. I valori di UPG pre trattamento non presentavano differenze statisticamente significative ($P>0,1$) tra i gruppi.

I risultati degli esami coprologici effettuati ai giorni -3, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 e 56 sono riassunti di seguito (grafico 6.2 e tabella 6.3).

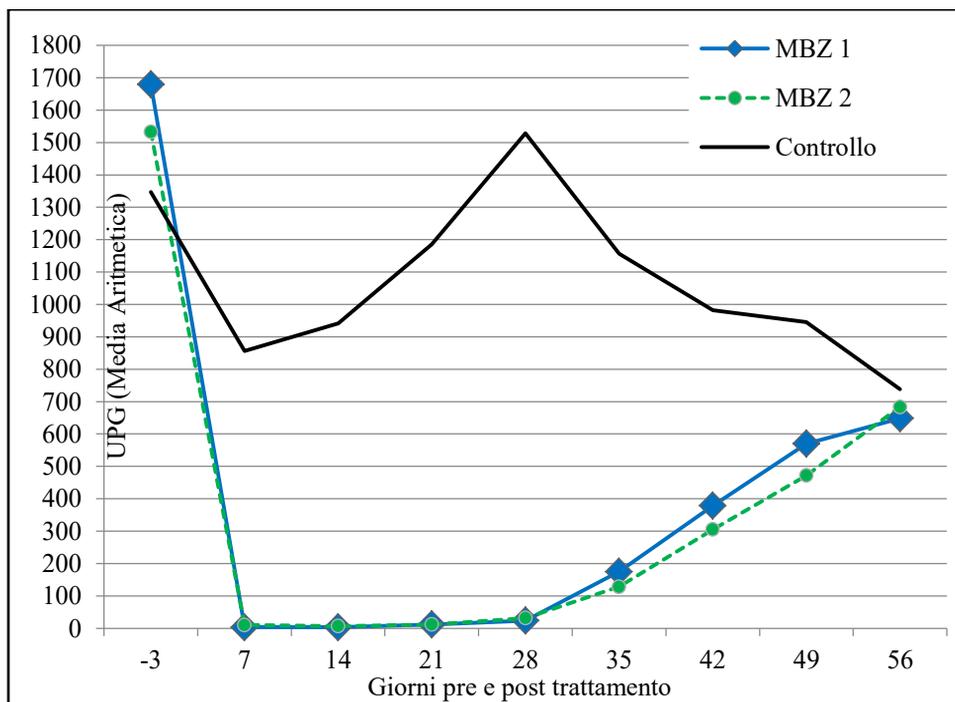


Grafico 6.2 Andamento della eliminazione delle uova nei differenti gruppi sperimentali.

Cinetica plasmatica, escrezione nel latte ed efficacia parassitologica del mebendazolo in asini naturalmente infetti da *Cyathostominae*

Tab. 6.3 Risultati esami corpologici pre e post trattamento in asini naturalmente infettati da *cyathostominae*

Giorno	Gruppo controllo		MBZ 1				MBZ 2			
	UPG (MA)	UPG (range)	UPG (MA)	UPG (range)	P value	FECR (%) (95 % CI)	UPG (MA)	UPG (range)	P value	FECR (%) (95 % CI)
-3	1347	1000-1800	1680	900-2240	0,1492	-	1533	730-2680	0,5858	-
7	857	450-1170	3	0-20	0,0000	99,6 S (98,4-100)	10	0,40	0,0000	98,8 S (97,1-99,9)
14	942	500-1340	3	0-20	0,0000	99,7 S (98,4-100)	7	0-30	0,0000	99,3 S (97,8-99,9)
21	1185	890-1450	12	0-30	0,0000	99,0 S (98,3-99,7)	12	0-30	0,0000	99,0 S (98,0-99,7)
28	1528	1110-2030	23	10-50	0,0000	98,5 S (97,5-99,2)	32	10-80	0,0000	97,9 S (95,2-99,1)
35	1157	610-2000	175	10-340	0,0007	84,9 R (80,8-94,3)	128	10-230	0,0004	88,9 R (82,9-95,9)
42	982	520-1370	378	190-610	0,0015	61,5 R (65,8-90,7)	305	40-450	0,0008	68,9 R (62,7-89,4)
49	945	600-1680	570	80-970	0,1040	36,5 R (41,4-80,9)	472	50-1100	0,0549	50,1 R (32,1-86,1)
56	738	530-1130	648	180-1170	0,6065	12,2 R (37,5-78,6)	683	70-1000	0,7509	7,5 R (17,5-75,9)

MA: media aritmetica; S:suscettibile; R: resistente

MBZ 1. Al giorno -3 la Media Aritmetica (MA) riferita al Gruppo Controllo ed al gruppo trattato con Mebendazolo al dosaggio utilizzato per il cavallo (MBZ 1) erano rispettivamente pari a 1347 e 1680 upg.

A 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 e 56 giorni dal trattamento i valori delle MA nel Gruppo C erano 857, 942, 1185, 1528, 1157, 982, 945 e 738 upg, rispettivamente; alle stesse date, le MA nel Gruppo MBZ 1 erano pari a 3, 3, 12, 23, 175, 378, 570 e 648 upg, rispettivamente, facendo registrare valori di FECR pari al 99,6% al giorno 7, 99,7% al giorno 14, 99,0% al giorno 21, 98,5% al giorno 28; per poi ridursi al di sotto del 90% dal giorno 35 fino al giorno 56.

MBZ 2. Al giorno -3 la Media Aritmetica (MA) riferita al Gruppo Controllo ed al gruppo trattato con Mebendazolo al dosaggio doppio rispetto a quello utilizzato di routine per il cavallo (MBZ 2) erano rispettivamente pari a 1347 e 1533 upg. A 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 e 56 giorni dal trattamento i valori delle MA nel Gruppo C erano come sopra; alle stesse date, le MA nel Gruppo MBZ 2 erano pari a 10, 7, 12, 32, 128, 305, 472 e 683 upg, rispettivamente, facendo registrare valori di FECR pari al 98,8% al giorno 7, 99,3% al giorno 14, 99,0% al giorno 21, 97,9% al giorno 28; per poi ridursi al di sotto del 90% dal giorno 35 fino al giorno 56.

Per entrambi i gruppi di trattamento i valori di UPG hanno dimostrato una differenza statisticamente significativa ($P < 0,001$) rispetto al gruppo controllo sino al ventottesimo giorno post-trattamento. Non è invece emersa differenza statisticamente significativa tra i valori di efficacia tra i due gruppi di trattamento (MBZ 1 e MBZ 2).

L'ERP, per entrambi i gruppi di trattamento è stato di 35 giorni.

6.4.3 Coprocolture

Gli esami coprocolturali eseguiti prima del trattamento (giorno -3) hanno evidenziato esclusivamente la presenza di *Cyathostominae*. Le coprocolture allestite dagli asini risultati positivi successivamente al trattamento antiparassitario hanno rilevato esclusivamente la presenza di *Cyathostominae* sia in entrambi i gruppi di trattamento sia nel gruppo controllo (figura 6.5).



Fig. 6.5 Larva di 3° stadio di *Cyathostominae* (Foto F. Buono)

6.5 Discussioni e conclusioni

La farmacocinetica dei BZ è particolarmente influenzata dalle proprietà fisico-chimiche e dai metaboliti di questi principi attivi. Questi composti sono parzialmente solubili in acqua ed il loro assorbimento e la loro farmacocinetica sono influenzati dalla loro solubilità in ambiente acquoso (Ngumuo et al., 1984). La rapida dissoluzione e conseguentemente l'assorbimento e l'eliminazione di alcuni BZ spiegano la loro breve presenza negli animali sottoposti a trattamento antiparassitario. Così i composti che hanno una maggiore solubilità sono caratterizzati da una minore permanenza rispetto ai quei benzimidazolici caratterizzati da una solubilità minore (McKellar e Scott, 1990). La differenza in efficacia, *in vivo*, dei vari benzimidazolici nei confronti dei parassiti, è stata pertanto attribuita alla diversa farmacocinetica che i diversi composti presentano negli ospiti (Bogan, 1983).

Il MBZ è un antielmintico ad ampio spettro efficace nei confronti dei principali parassiti intestinale degli equini quali grandi e piccoli strongili, *Parascaris* spp. e *Oxyuris equi*.

Il MBZ, il fenbendazolo e l'ossifendazolo sono inoltre registrati per l'utilizzo nell'asino in alcuni paesi quali l'Inghilterra e l'Australia (McKellar e Scott, 1990). La farmacocinetica dell'ossifendazolo e dell'albendazolo è già stata precedentemente studiata nell'asino (Gokbulut et al., 2006) mentre la farmacocinetica del MBZ è stata riportata, per la prima volta, nel presente studio.

I risultati da noi ottenuti hanno indicato che la disposizione plasmatica del MBZ è differente se comparata a quella dell'ossifendazolo e dell'albendazolo quando somministrato agli asini ai medesimi dosaggi (Gokbulut et al., 2006). È stato riportato che il picco di concentrazione plasmatico e l'area al di sotto della curva dell'ossifendazolo (C_{max} : 0,49 $\mu\text{g/ml}$, AUC: 5,17 $\mu\text{g}\cdot\text{h}^2/\text{ml}$) e dell'albendazolo (C_{max} : 0,08 $\mu\text{g/ml}$, AUC: 0,84 $\mu\text{g}\cdot\text{h}^2/\text{ml}$) sono stati più alti rispetto a quelli del mebendazolo (C_{max} : 0,04 $\mu\text{g/ml}$, AUC: 0,78 $\mu\text{g}\cdot\text{h}^2/\text{ml}$). Tuttavia, nel presente studio è emerso che i valori di $t_{1/2\lambda_z}$ (11,97 h) e MRT (20,34 h) del MBZ sono maggiori rispetto a quelli dell'ossifendazolo ($t_{1/2\lambda_z}$: 4,49 h e MRT: 10,95 h) e dell'albendazolo ($t_{1/2\lambda_z}$: 6,65 h e MRT: 9,15 h) quando somministrati allo stesso dosaggio (10 mg/kg). Queste differenze probabilmente riflettono la minore solubilità in acqua e conseguentemente il minor assorbimento e/o il passaggio più rapido del MBZ se confrontato con l'albendazolo e l'ossifendazolo. Analogamente, nell'uomo è stata osservata una minore biodisponibilità sistemica del MBZ e questo rispecchierebbe lo scarso assorbimento di questo farmaco nel tratto gastroenterico (Münst et al., 1980). Alte concentrazioni di farmaco a livello intestinale potrebbero essere efficaci nei confronti dei parassiti che vivono nel suo lume, tuttavia una concentrazione plasmatica bassa, così come dimostrato nel cavallo, potrebbe non essere efficace nei confronti degli stadi larvali in migrazione dei grossi strongili e verso le larve in ipobiosi dei piccoli strongili. È stato, infatti, riportato, che i BZ incluso il MBZ (al dosaggio di 8,8 mg/kg P.V.) sono altamente efficaci nei confronti degli stadi adulti dei grandi e piccoli strongili, degli adulti di *O. equi* e delle L4 (Colglazier et al., 1977).

I risultati ottenuti dal presente studio dimostrano che, nell'asino, l'aumento del dosaggio del MBZ è correlato all'innalzamento dei livelli plasmatici di questa molecola. Valori significativamente maggiori di AUC e C_{max} sono stati riscontrati in seguito alla somministrazione del MBZ al dosaggio di 20 mg/kg rispetto al dosaggio di 10 mg/kg (tabella 6.2). I valori di C_{max} e AUC del MBZ sono aumentati rispettivamente da 0,04 $\mu\text{g/ml}$ e 0,78 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$ al dosaggio di 10 mg/kg P.V. a valori pari a 0,07 $\mu\text{g/ml}$ e 1,42

$\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$ al dosaggio di 20 mg/kg. Conseguentemente l'aumento del dosaggio terapeutico potrebbe rappresentare una strategia al fine di raggiungere concentrazioni plasmatiche maggiori ed ottenere un'efficacia anche nei confronti delle larve in migrazione degli strongili intestinali o nei confronti dei parassiti polmonari dell'asino; tuttavia l'efficacia di questa strategia dovrebbe essere confermata con ulteriori studi prima di essere applicata.

Esistono differenze significative circa la farmacocinetica dei BZ tra i monogastrici ed i poligastrici (Marriner e Bogan, 1981); i valori plasmatici del MBZ ottenuti nel presente studio differiscono notevolmente da quelli riscontrati, in precedenti studi, nelle pecore e nelle capre (Galtier et al., 1994; Pandey e Roy, 1998). Il presente studio dimostra che la concentrazione plasmatica del MBZ in seguito a somministrazione *per os* è inferiore nell'asino rispetto a quanto osservato nelle pecore e nelle capre. Nelle pecore i valori di C_{max} (0,107 $\mu\text{g}/\text{ml}$) e AUC (3,27 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$) del MBZ in seguito a somministrazione per via orale al dosaggio di 25 mg/kg P.V. erano maggiori rispetto a quelli osservati nell'asino, nel presente studio, in seguito alla somministrazione, sempre *per os*, al dosaggio di 20 mg/kg. Inoltre, Pandey e Roy (1998) hanno riportato che, in seguito alla somministrazione *per os* del MBZ ad un dosaggio di 40 mg/kg P.V., la concentrazione plasmatica è stata mantenuta per 120 ore ed il suo picco è stato di 5,8 $\mu\text{g}/\text{ml}$. La minore concentrazione plasmatica che si raggiunge nell'asino rispetto a quanto osservato nei ruminanti è probabilmente dovuto alle differenze anatomiche e fisiologiche che si evidenziano nelle diverse specie animali. Le caratteristiche anatomiche influenzano il passaggio degli alimenti per cui la biodisponibilità e la farmacocinetica dei farmaci antiparassitari potrebbero essere influenzate dal differente tempo di transito a livello intestinale nelle differenti specie animali (McKellar e Scott, 1990). Il rapido passaggio degli alimenti nel tratto intestinale dei monogastrici (cani e cavalli) rispetto ai ruminanti, che sono invece caratterizzati da un tempo di transito superiore, determina anche una minore biodisponibilità dei farmaci antiparassitari. È stato inoltre dimostrato che le variazioni nella qualità (Gokbulut et al., 2007) e la qualità (Gokbulut et al., 2010) della dieta potrebbero influenzare la biodisponibilità dei farmaci antiparassitari in differenti specie animali.

A causa della bassa biodisponibilità del MBZ a livello sistemico e del basso livello di escrezione nel latte (rapporto latte/plasma = 0,18 al dosaggio di 20 mg/kg P.V.), in associazione con bassi valori di MRL fanno

si che il MBZ può essere utilizzato, al dosaggio di 10 mg/kg P.V., nelle asine in lattazione.

I risultati del presente studio, hanno inoltre dimostrato, sulla base del FECRT, un'elevata efficacia (>95%) sino al ventottesimo giorno post-trattamento, ed una buona tollerabilità del MBZ pasta orale sia al dosaggio utilizzato nel cavallo (10 mg/kg P.V.) sia al doppio del dosaggio (20 mg/kg P.V.) in asini naturalmente infettati da *Cyathostominae*.

La popolazione di cyathostomi riscontrata negli asini oggetto di studio si è dimostrata sensibile al trattamento con MBZ così come confermato dai valori di FECR.

La ricomparsa delle uova nei giorni 7, 14, 21, 28 e 35 non ha tuttavia influenzato l'efficacia antiparassitaria di questa molecola, confermando così, nell'asino, un valore di ERP simile a quello del cavallo (pari a 4 settimane). In base ai risultati ottenuti si può quindi affermare che, nella specie asinina, il valore di ERP per il MBZ sarebbe paragonabile a quello del cavallo ad entrambi i dosaggi; infatti come suggerito dalle linee guida AAEP il MBZ nell'asino presenterebbe, ad elevati dosaggi, un valore di ERP >80% fino alla 5 settimana post-trattamento.

I risultati ottenuti nel corso del presente studio hanno evidenziato che non ci sono differenze statisticamente significative sia in termini di FECR che di ERP nei due gruppi di trattamento e per questo motivo il MBZ potrebbe essere somministrato nell'asino allo stesso dosaggio del cavallo (10 mg/kg). Questi risultati sono in linea con gli studi condotti da Grosenbaugh et al. (2011) che hanno dimostrato che il fenbendazolo, l'ivermectina e la doramectina, nell'asino, possono essere utilizzati allo stesso dosaggio del cavallo.

Uno studio recente (Gokbulut et al., 2014) ha evidenziato che il PYR sia in formulazione pasta sia in formulazione granulato può essere somministrato, per il controllo delle elmintosi sostenute dagli strongili intestinali nella specie asinina, allo stesso dosaggio utilizzato nel cavallo.

In conclusione, sia nel cavallo che nell'asino è possibile utilizzare gli stessi dosaggi di MBZ per il trattamento delle strongilosi intestinali; inoltre questa molecola può essere utilizzata come antiparassitario nelle aziende asinine destinate alla produzione di latte per il consumo umano.

Bibliografia

- Bogan, J.A (1983). Absorption and distribution. *In*: Bogan, J.A., Lees, P., Yoxall, A.T. (eds.). *Pharmacological basis of large animal medicine*. Blackwell Scientific Publication, Oxford. pp. 9-11.
- Clayton, H.M. e Neave, R.M. (1979). Efficacy of mebendazole against *Dictyocaulus arnfieldi* in the dokey. *Veterinary Record*, 104: 571-572.
- Coles, G.C., Bauer, C., Borgsteede, F.H.M., Geerts, S., Klei, T.R., Taylor, M.A., Waller, P.J. (1992). World association for the advancement of veterinary parasitology (WAAP) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*, 44: 35-44.
- Coles, G.C., Jackson, F., Pomroy, W.E., Vercruyse, J. (2006). The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*, 136: 167-185.
- Colglazier, M.L., Enzie, F.D., Kates, K.C. (1977). Critical anthelmintic trials in ponies with four benzimidazoles: mebendazole, cambendazole, fenbendazole, and albendazole. *Journal of Parasitology*, 63: 724-727.
- Dawson, M., Allan, R.J., Watson, T.R. (1982). The pharmacokinetics and bioavailability of mebendazole in man: a pilot study using [3H]-mebendazole. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 14(3): 453-455.
- Dollery, C.T. (1999). Mebendazole. *In*: *Therapeutic Drugs*, vol 2. (2nd ed.). Churchill Livingstone, Edinburgh. pp. A51-A53.
- EMA-European Medicines Evaluation Agency (1999) . Mebendazole Summary Report by CVMP. EMA/MRL/625/99-Final. July 1999. EMA, London.
- Galtier, P., Coulet, M., Sutra, J.F., Biro-Sauver, B., Alvinerie, M. (1994). *Fasciola hepatica*: mebendazole and thiabendazole pharmacokinetics in sheep. *Experimental Parasitology*, 79: 166-176.
- Gokbulut, C., Boyacioglu, M., Karademir, U. (2005). Plasma pharmacokinetics and faecal excretion of ivermectin and doramectin following oral administration in donkeys. *Research of Veterinary Science*, 79: 233-238.
- Gokbulut, C., Akar, F., McKellar, Q.A. (2006). Plasma disposition and faecal excretions of oxfendazole, fenbendazole and albendazole following oral administration to dokeys. *Veterinary Journal*, 172: 166-172.
- Gokbulut, C., Karademir, U., Boyacioglu, M., Akar, F. (2007). The effect of diet type on the plasma disposition of triclabendazole in goats. *Research in Veterinary Science*, 82: 388-391.
- Gokbulut, C., Boyacioglu, M., Karademir, U., Aksit, D. (2010). The effect of fasting on the plasma disposition of triclabendazole following oral administration in goats. *Research in Veterinary Science*, 89: 415-417.
- Gokbulut, C., Di Loria, A., Günay, N., Masucci, R., Veneziano, V. (2011). Plasma disposition, haircoat depletion and anthelmintic efficacy of eprinomectin following pour-on administration in donkeys. *American Journal of Veterinary Research*, 72: 1639-1645.
- Gokbulut, C., Naturali, S., Rufrano, D., Anastasio, A., Yalilikilinc, H.S., Veneziano, V. (2013). Plasma disposition and milk excretion of eprinomectin following pour-on administration in lactating donkey. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 36: 302-305.

- Gokbulut, C., Aksit D., Smaldone, G., Mariani, U., Veneziano, V. (2014). Plasma pharmacokinetics, faecal excretion and efficacy of pyrantel pamoate paste and graule formulations following *per os* administration in donkeys naturally infected with intestinal strongylidae. *Veterinary Parasitology*, 205: 186-192.
- Gotshall, D.W., Theorides, V.J., Wang, R. (1990). The metabolism of benzimidazole anthelmintics, *Parasitology Today*, 6: 115-124.
- Grosenbaugh, D.A., Reinemeyer, C.R., Figueiredo, M.D. (2011). Pharmacology and therapeutics in donkeys. *Equine Veterinary Education*, doi: 10.1111/j.2042-3292.2011.
- Kaplan, R.M. e Nielsen, M.K. (2010). An evidence-based approach to equine parasite control: it ain't the 60s anymore. *Equine Veterinary Education*, 22: 306-316.
- Lester, H.E. e Matthews, J.B (2014). Faecal worm egg count analysis for targeting anthelmintic treatment in horses: points to consider. *Equine Veterinary Journal*, 46: 139-145.
- Lizzaraga, I., Sumano, H., Brumbaugh, G.W. (2004). Pharmacological and pharmacokinetic differences between donkeys and horses. *Equine Veterinary Education*, 16: 102-112.
- Marriner, S.E. e Bogan, J.A. (1981). Pharmacokinetics of oxfendazole in sheep. *American Journal of Veterinary Research*, 42: 1143-1145.
- M.A.F.F. (1984). Manual of Veterinary Investigation Laboratory Techniques. Reference book, pp. 390.
- McKellar, Q.A. e Scott, E.W. (1990). The benzimidazole anthelmintic agents: a review. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 13: 223-247.
- Münst, G.J., Karlaganis, G., Bircher, J. (1980). Plasma concentrations of mebendazole during treatment of echinococcosis: preliminary results. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 17(5): 375-378.
- Negumuo, A.J., Marriner, S.E., Bogan, J.A. (1984). The pharmacokinetics of fenbenazole and oxfendazole in cattle. *Veterinary Research Communications*, 8: 187-193.
- Nielsen, M.K., Vidyashankar, A.N., Andersen, U.V., De Lisi, K., Pilegaard, K., Kaplan, R.M. (2010). Effects of fecal collection and storage factors on strongylid egg counts in horses. *Veterinary Parasitology*, 167: 55-61.
- Nielsen, M.K., Mittel, L., Grice, A., Erskine, M., Graves, E., Vaala, W., Tully, R.C., French, D.D., Bowman, R., Kaplan, R.M. (2013). AAEP Parasite Control Guidelines. *American Association of Equine Practitioners*. On-line at www.aaep.org.
- Pandey, S.N. e Roy, B.K. (1998). Disposition kinetics of mebendazole in plasma, milk and ruminal fluid of goats. *Small Ruminant Research*, 27: 111-117.
- Reinemeyer, C.R. e Nielsen, M.K. (2013). Diagnostic techniques for equine parasitism. *In: Handbook of Equine Parasite Control*. Wiley-Blackwell, Oxford, UK. pp 103-127.
- Vidyashankar, A.N., Kaplan, R.M., Chan, S. (2007). Statistical approach to measure the efficacy of anthelmintic treatment on horse farms. *Parasitology*, 134: 2027-2039.
- Veneziano, V., Di Loria, A., Masucci, R., Di Palo, R., Brianti, E., Gokbulut, C. (2011). Efficacy of eprinomectin pour-on against *Dictyocaulus arnfieldi* infection in donkeys (*Equus asinus*). *Veterinary Journal*, 190: 414-415.

Capitolo 7

Effetti del Pyrantel, del Febendazolo, dell'Ivermectina e della Moxidectina sulla *Faecal Egg Count* e sull'*Egg Reappearance Period* negli asini

7.1 Introduzione

Gli endoparassiti costituiscono un problema di comune riscontro negli animali da reddito, asini e cavalli inclusi e le elmintiasi possono compromettere lo stato di salute degli animali. I principali segni clinici che è possibile riscontrare in corso di infestazioni parassitarie sono perdita di peso, ulcere intestinali, scarse performance produttive e/o sportive e coliche (Uhlinger, 2010).

Gli strongili intestinali, specialmente i piccoli strongili, sono i principali endoparassiti che a livello mondiale si riscontrano in cavalli ed asini (Tzelos et al., 2017).

I trattamenti antiparassitari rappresentano la principale strategia di controllo delle parassitosi (Porr et al., 2017), e l'utilizzo dei farmaci antielmintici ha effetti positivi sia sulla crescita sia sulle performances degli animali (Reinemeyer e Clymer, 2002).

Le principali molecole utilizzate nel controllo delle parassitosi intestinali, sia nell'asino che nel cavallo, sono rappresentate dalle tetraidropirimidine (PYR), dai benzimidazolici (BZ) e dai lattoni macrociclici (IVM e MOX) (Nielsen et al., 2013).

Le differenti strategie di trattamento utilizzate a livello mondiale hanno permesso di ridurre l'insorgenza di sintomatologie cliniche associate alle elmintiasi, specialmente quelle sostenute agli strongili intestinali; tuttavia l'utilizzo irrazionale di queste molecole disponibili in commercio ha comportato lo sviluppo dell'antielmintico resistenza da parte dei parassiti specialmente Cyathostominae (Matthews, 2014).

L'antielmintico resistenza è definita come un cambiamento genetico, ereditabile, in una popolazione parassitaria che presenta una quota significativa di parassiti in grado di sopravvivere ad un trattamento antiparassitario che in precedenza era invece efficace (Vidyashankar et al., 2012).

Nel valutare l'efficacia antielmintica delle classi farmacologiche bisognerebbe considerare due importanti parametri: il *faecal egg count reduction* (FECR) e l'*egg reappearance period* (ERP) (Porr et al., 2017).

Il FECR indica la percentuale di riduzione della FEC dopo due settimane dal trattamento antiparassitario.

L'*Egg Reappearance Period* è definito come l'intervallo di tempo che intercorre tra l'ultimo trattamento antiparassitario efficace e la ricomparsa di un numero significativo di uova di parassiti intestinali nelle feci. La

valutazione dell'ERP in un'azienda assume un importante significato in quanto un suo ridotto valore è alla base dello sviluppo dell'antelmintico resistenza (Nielsen et al., 2013).

Nel cavallo, l'antelmintico resistenza da parte dei CY (piccoli strongili) nei confronti dei BZ e del PYR è stata riportata rispettivamente in 14 e 12 paesi (Peregrine et al., 2014); sebbene l'efficacia dei LM sia ancora alta, sono stati tuttavia riportati casi di ridotta efficacia dell'IVM considerando il *Faecal egg count reduction test* (FECRT) sia in base alla valutazione dell'ERP (Tzelos e Matthews, 2016). Una ridotta efficacia della MOX, intesa come un ridotto ERP, è stata inoltre osservata in differenti studi a livello mondiale (Tzelos et al., 2017; Bellaw et al., 2017).

Nell'asino sono registrate un numero limitato di molecole antiparassitarie e proprio per questo motivo gli antelmintici utilizzati nei cavalli e nei ruminanti, vengo spesso somministrati *extra label*, al medesimo dosaggio, anche nelle specie asinina; tuttavia è stato riportato che questa specie animale ha una capacità maggiore, rispetto al cavallo, di metabolizzare alcune classi farmacologiche (Grosenbaugh et al., 2011); proprio per tale motivo, queste molecole probabilmente, dovrebbero essere somministrate nell'asino ad un dosaggio maggiore o con una frequenza diversa al fine di mantenere una concentrazione farmacologica efficace (Grosenbaugh et al., 2011). Questo aumento di dose non sempre è stato necessario come confermato da alcuni studi sugli antiparassitari (Gokbulut et al., 2014; 2016).

Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare, alla dose specifica per il cavallo, l'efficacia antiparassitaria dei quattro principi attivi (PYR, FBZ, IVM, MOX) comunemente utilizzati per il controllo delle strongilosi negli asini attraverso l'utilizzo del FECRT e dell'ERP così come riportato dalle linee guida proposte dalla *AAEP* (Nielsen et al., 2013).

7.2 Materiali e metodi

La prova è stata condotta nella estate del 2015 in due aziende asinine localizzate rispettivamente in regione Campania (sud Italia) e nel Lazio (centro Italia), denominate rispettivamente azienda "A" ed azienda "B".

Al momento della prova l'Azienda A era composta da 49 asini meticci e l'Azienda B era composta da 56 capi meticci. In entrambe le aziende, da precedenti controlli parassitologici, gli asini presentavano una accertata infezione da Strongili Intestinali. Gli asini erano allevati come animali

destinati alla produzione di alimenti per il consumo umano (DPA), latte e carne, e non erano stati sottoposti a trattamento antiparassitario nei sei mesi antecedenti l'inizio della prova.

Al fine di valutare la gestione aziendale, in entrambe le aziende è stato compilato un questionario riportante le seguenti informazioni: nome e microchip dell'asino, genere, età, BCS, peso, eventuale promiscuità con altri animali sia da compagnia che da reddito (con particolare attenzione alla presenza di cavalli e/o muli), il tipo di alimentazione, il numero dei trattamenti antiparassitari effettuati nell'arco di un anno e le molecole utilizzate.

7.2.1 Quadro parassitologico aziendale e peso degli animali

Per la valutazione del quadro parassitologico aziendale e per l'individuazione dei soggetti positivi agli SI, su tutti gli asini presenti nelle due aziende, due giorni prima del trattamento (Giorno -2), sono stati eseguiti esami copromicroscopici quali-quantitativi individuali al fine di calcolare i valori di Faecal Egg Counts (FECs) per ciascun asino.

Per identificare le specie di SI presenti, nello stesso giorno, per tutti i soggetti risultati positivi, sono state allestite coproculture di gruppo di 5 animali ciascuno.

7.2.2 Gruppi sperimentali

Sulla base dei risultati parassitologici ottenuti, sono stati selezionati in entrambe le aziende 24 soggetti:

Azienda A: 24 asini meticci di sesso femminile, in asciutta, con una età media di 9 anni (1,5-18 anni) del peso variabile tra 170-320 kg, non trattati con antielmintici nei 6 mesi antecedenti all'inizio della prova, tutti positivi agli SI con valori di FEC ≥ 300 upg.

Azienda B: 24 asini meticci di sesso femminile, in asciutta, con una età media di 4 anni (2-12 anni) del peso variabile tra 140-340 kg, non trattati con antielmintici nei 6 mesi antecedenti all'inizio della prova, tutti positivi agli SI con valori di FEC ≥ 300 upg.

Gli asini, identificati mediante targhetta numerata applicata alla cavezza e microchip, sono stati dapprima ordinati, sulla base della loro FEC, dai meno parassitati ai più parassitati, e successivamente ripartiti, sia

nell'azienda "A" sia nell'azienda "B", *at random*, in quattro gruppi sperimentali costituiti da 6 asini ciascuno:

- ✓ **GRUPPO PYR** – trattato con Pyrantel pasta al dosaggio terapeutico utilizzato per i cavalli (6,94 mg/kg P.V. – Strike Pasta Orale - ACME)
- ✓ **GRUPPO FBZ** – trattato con Fenbendazolo pasta al dosaggio terapeutico utilizzato per i cavalli (7,5 mg/kg P.V. – Panacur 10 % Pasta Orale – MSD Animal Health)
- ✓ **GRUPPO IVM** – trattato con Ivermectina pasta al dosaggio terapeutico per i cavalli (200 mcg/kg P.V. – Eqvaln Pasta Orale)
- ✓ **GRUPPO MOX** - trattato con Moxidectina gel orale al dosaggio terapeutico utilizzato per i cavalli (400 mcg/kg P.V. – Equest Gel Orale – Fort Dodge).

Nel corso della prova, in entrambe le aziende, i quattro gruppi sperimentali sono stati tenuti insieme nelle medesime condizioni e l'acqua è stata disponibile *ad libitum*.

7.2.3 Trattamenti antiparassitari

Il giorno del trattamento (giorno 0), formulazioni di PYR pasta orale, FBZ pasta orale, IVM pasta orale e MOX gel orale, commercializzate per il trattamento delle endoparassitosi negli equini, sono state somministrate agli asini *per os* al dosaggio raccomandato per i cavalli. Al fine di somministrare la dose terapeutica ottimale, ogni asino è stato pesato utilizzando il nomogramma proposto dal *The Donkey Sanctuary* (figura 7.1) (Appendice II).

La quantità di farmaco somministrata è stata calcolata per ogni animale in relazione al peso di ciascuno di esso ed il trattamento è stato eseguito in prima mattinata.



Fig. 7.1 Misurazione circonferenza toracica per determinazione del peso
(Foto F. Buono)

Gli asini appartenenti ai quattro gruppi di trattamento hanno ricevuto un'unica somministrazione di farmaco antiparassitario.

Tutti gli animali sottoposti al trattamento antiparassitario sono stati tenuti sotto osservazione, per valutare l'eventuale insorgenza di reazioni indesiderate, per l'intera giornata del trattamento (giorno 0) e poi settimanalmente sino alla fine della prova.

7.2.4 Analisi parassitologiche – Valutazione dell'Efficacia Antielmintica

Le analisi parassitologiche sono state eseguite in entrambe le aziende sui 24 asini con prelievi di feci direttamente dall'ampolla rettale (figura 7.2).

I campioni di feci sono stati conservati ad una temperatura di refrigerazione (4°C) (Zajac e Conboy, 2012) per essere sottoposti ad esami copromicorscopici quali-quantitativi, al fine di determinare la FEC per ogni singolo asino, entro 48 ore dal prelievo.



Fig. 7.2 Prelievo di feci dall'ampolla rettale (Foto F. Buono)

Ai giorni -2, 7 (I settimana), 14 (II settimana), 21 (III settimana), 28 (IV settimana), 35 (V settimana), 42 (VI settimana), 49 (VII settimana), 56 (VIII settimana), 63 (IX settimana), 70 (X settimana) 77 (XI settimana) ed 84 (XII settimana) dal trattamento per ogni campione di feci è stato eseguito un esame copromicroscopico quali-quantitativo ed un esame coproculturale di gruppo a pool.

7.2.5 Esami coprologici

7.2.5.1 FEC (*Faecal Egg Count*)

Nel corso di questa indagine sono stati effettuati esami coprologici individuali quali-quantitativi, al fine di determinare la FEC di ogni singolo animale. La tecnica adoperata è stata il *Special modification of McMaster method* – specifica per i bovini e per gli altri grandi erbivori come gli asini (Appendice V) (Genchi et al., 2014), avente un limite di sensibilità analitica pari a 10 UPG, utilizzando una soluzione flottante a base di saccarosio con un peso specifico di 1.250 (Cringoli et al., 2004).

La conta delle uova è stata effettuata in entrambe le camere di lettura ed il numero delle UPG è stato calcolato sommando le uova contate nelle due camere moltiplicando il valore ottenuto per 10.

Le uova degli strongili intestinali sono state riscontrate con la maggiore prevalenza e sono state le uniche ad essere incluse nell'analisi dei risultati.

7.2.5.2 Esami coproculturali

In laboratorio sono state allestite coproculture per ogni azienda con pool di massimo 3 asini (2 per gruppo) al fine di consentire la crescita *in vitro* delle larve di terzo stadio di SI eventualmente presenti nelle feci (figura 7.3). I campioni fecali sono stati mescolati con acqua e vermiculite ed incubati in apposite vaschette di plastica per 7-10 giorni a 25-27°C. Successivamente, si è proceduto alla raccolta delle L3 con apparecchio di Baermann, per poi identificarle (fino a 100 quando disponibili), utilizzando le chiavi proposte dal MAFF (1986) e Bevilaqua et al. (1993).



Fig. 7.3 Incubazione campioni di feci per consentire lo sviluppo della L3 (Foto F. Buono)

7.2.5.3 FECRT ed ERP

Microsoft® Office Excel® è stato utilizzato per la raccolta e l'analisi dei dati. Per ogni gruppo di trattamento è stata calcolata la media aritmetica delle UPG sia al giorno -2 sia nelle settimane successive al trattamento antiparassitario.

L'efficacia (%) del trattamento è stata calcolata ai giorni 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77 ed 84 in termini di FECR utilizzando la seguente formula:

$$FECR = \frac{(media\ UPG\ pre\ trattamento - media\ UPG\ post\ trattamento)}{media\ UPG\ pre\ trattamento} \times 100$$

La AAEP ha suggerito dei valori cut-off per interpretare i risultati del FECRT e dell'ERP delle diverse classi farmacologiche utilizzate per il controllo dell'elmintosi nel cavallo.

L'efficacia delle diverse molecole è stata valutata in accordo con l'AAEP Parasite Control Guidelines (Nielsen et al., 2013) come segue (tabella 7.1).

Tab. 7.1 Valori suggeriti dalla AAEP Parasite Control Guidelines per l'interpretazione del FECR negli strongili intestinali.

Classe farmacologica	Efficacia (in assenza di resistenza)	Risultati FECRT		
		Suscettibile (nessuna evidenza di resistenza)	Sospetta resistenza	Resistenza
FBZ/OBZ	99%	>95%	90-95%	<90%
PYR	94-99%	>90%	85-90%	<85%
IVM/MOX	99,9%	>98%	95-98%	<95%

Modificato da Nielsen et al. (2013)

Per ERP si intende l'intervallo di tempo che intercorre tra il trattamento antelmintico e la ricomparsa delle uova nelle feci.

Attualmente l'ERP varia a seconda delle classi farmacologiche da 4 a 12 settimane.

Nella tabella che segue (tabella 7.2) si schematizzano i valori di ERP così come indicati nelle AAEP Parasite Control Guidelines:

Tab. 7.2. *Cyathostominae* egg reappearance period (ERP) per gli antelmintici per equini

Principio attivo	ERP in corso di efficacia	ERP quando il farmaco è stato introdotto la prima volta	ERP cut-off
BZ	4-5 settimane	6 settimane	80% ^a
PYR	4-5 settimane	5-6 settimane	80% ^b
IVM	6-8 settimane	9-13 settimane	90% ^c
MOX	10-12 settimane	16-22 settimane	90% ^d

^aMcBeath et al., (1978);

^bBoersema et al., (1995, 1996);

^cBorgsteede et al., 1993; Boersema et al., (1996); Demeulenaere et al., (1997);

^dJacobs et al., (1995); DiPietro et al., (1997); Demeulenaere et al., (1997).

Il calcolo del cut-off dell'ERP è dato, per ciascuna classe farmacologica, approssimativamente con il 10% in meno del valore dell'efficacia.

Il programma RESO (versione 2.0) è stato utilizzato per il calcolo dell'efficacia con Limiti di Confidenza del 95%.

7.3 Risultati

Durante le prime ore dopo il trattamento e nel prosieguo dello studio nessun effetto indesiderato è stato osservato negli animali oggetto di studio per le differenti molecole utilizzate .

I risultati ottenuti nell'azienda "A" e "B" sono schematizzati nelle tabelle seguenti (tabella 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 7.10, 7.11).

Nell'azienda "A", la *faecal egg count reduction* calcolata dopo due settimane dal trattamento antiparassitario ha evidenziato un'elevata efficacia per tutte le molecole: 100% (IVM e MOX); 99,8% (FBZ); 99,3% (PYR). I valori di *ERP* rappresentati nei grafici 7.1, 7.2, 7.3 e 7.4 sono in accordo con quanto riportato dalle linee guida della *AAEP Parasite Control Guidelines* (Nielsen et al., 2013), infatti sia il PYR che il FBZ hanno presentato un valore di ERP > 80% sino alla sesta settimana post-trattamento mentre, IVM e MOX hanno presentato un valore di ERP > 90% rispettivamente sino alla 12° ed 11° settimana post-trattamento. Alla

12° settimana post trattamento la MOX ha mostrato un valore di FECR = 84,1%.

Nell'azienda "B" la *faecal egg count reduction* calcolata dopo due settimane dal trattamento antiparassitario ha dimostrato un'elevata efficacia da parte dei LM (100%) tuttavia ha rivelato una sospetta resistenza nei confronti del PYR (FECR = 86,3%) e una resistenza nei confronti del FBZ (FECR = 83,9%). Per queste due molecole, in considerazione della mancata efficacia a due settimane, i valori di ERP non sono calcolabili.

Di contro è importante evidenziare che i valori di ERP per IVM e per MOX sono risultati inferiori rispetto ai quanto suggerito dalla linee guida con valori <90% rispettivamente a 8 (89,3% per IVM) e 9 settimane (89,9% per MOX).

Gli esami coproculturali eseguiti prima del trattamento (giorno -2) hanno evidenziato la presenza di *Cyathostominae* e di *Strongylus vulgaris* sia nell'azienda A sia nell'azienda B.

Le coproculture allestite dagli asini risultati positivi successivamente al trattamento antiparassitario hanno rilevato esclusivamente la presenza di *Cyathostominae* in entrambe le aziende oggetto di studio.

Effetti del Pyrantel, del Febendazolo, dell'Ivermectina e della Moxidectina sulla *Faecal Egg Count* e sull'*Egg Reappearance Period* negli asini

Tab. 7.3 Efficacia del PYR nell'azienda "A"

Settimana	0	+1	+2	+3	+4	+5	+6	+7	+8	+9	+10	+11	+12
N° asini	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
M.A.	673,3	5,0	5,0	8,3	13,3	23,3	73,3	145,0	193,3	385,0	550,0	1001,7	576,7
FECR (%)		99,3	99,3	98,8	98,0	96,5	89,1	78,5	71,3	42,8	18,3	-48,8	14,4
Var. Rid.		0,6	0,3	0,3	0,3	0,4	0,2	0,3	0,4	0,2	0,2	0,2	0,2
95%CI sup.		99,9	99,8	99,6	99,4	99,0	96,0	92,6	91,7	78,7	71,2	47,9	68,1
95%CI inf.		96,3	97,5	96,4	93,7	87,4	70,0	37,5	0,3	-53,6	-132,0	-324,9	-130,1
		EFF	EFF	EFF	EFF	EFF	SR	R	R	R	R	R	R

M.A.:media aritmetica; FECR=*faecal egg count reduction*; Var.. Rid.: variazione riduzione; 95% C.I. sup.: intervallo di confidenza superiore; 95% C.I. inf.: intervallo di confidenza inferiore; EFF: efficace; SR: sospetta resistenza; R: resistente.

Tab. 7.4 Efficacia del FBZ nell'azienda "A"

Settimana	0	+1	+2	+3	+4	+5	+6	+7	+8	+9	+10	+11	+12
N° asini	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
M.A.	725,0	0,0	1,7	1,7	1,7	10,0	41,7	158,3	283,3	501,7	633,3	873,3	665,0
FECR (%)		100	99,8	99,8	99,8	98,6	94,3	78,2	60,9	30,8	12,6	-20,5	8,3
Var. Rid.		-	1,1	1,1	1,1	0,5	0,4	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1
95%CI sup.		-	100	100	100	99,7	98,5	91,1	84,6	71,7	68,6	51,4	56,4
95%CI inf.		-	98,0	98,0	98,0	94,2	78,3	46,5	1,1	-69,0	-143,1	-198,3	-92,9
		EFF	EFF	EFF	EFF	EFF	SR	R	R	R	R	R	R

M.A.:media aritmetica; FECR=*faecal egg count reduction*; Var.. Rid.: variazione riduzione; 95% C.I. sup.: intervallo di confidenza superiore; 95% C.I. inf.: intervallo di confidenza inferiore; EFF: efficace; SR: sospetta resistenza; R: resistente.

Effetti del Pyrantel, del Febendazolo, dell'Ivermectina e della Moxidectina sulla *Faecal Egg Count* e sull'*Egg Reappearance Period* negli asini

Tab. 7.5 Efficacia dell'IVM nell'azienda "A"

Settimana	0	+1	+2	+3	+4	+5	+6	+7	+8	+9	+10	+11	+12
N° asini	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
M.A.	756,7	0,0	0,0	1,7	0,0	0,0	0,0	1,7	0,0	10,0	11,7	40,0	50,0
FECR (%)		100	100	99,8	100	100	100	99,8	100	98,7	98,5	94,7	93,4
Var. Rid.		-	-	1,0	-	-	-	1,0	-	0,3	0,7	0,5	0,3
95%CI sup.		-	-	100	-	-	-	100	-	99,6	99,7	98,8	98,0
95% CI inf.		-	-	98,1	-	-	-	98,1	-	95,8	90,6	76,3	78,4
		EFF	EFF	EFF	EFF	EFF	EFF	EFF	EFF	EFF	EFF	R	R

M.A.:media aritmetica; FECR=*faecal egg count reduction*; Var.. Rid.: variazione riduzione; 95% C.I. sup.: intervallo di confidenza superiore; 95% C.I. inf.: intervallo di confidenza inferiore; EFF: efficace; SR: sospetta resistenza; R: resistente.

Tab. 7.6 Efficacia della MOX nell'azienda "A"

Settimana	0	+1	+2	+3	+4	+5	+6	+7	+8	+9	+10	+11	+12
N° asini	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
M.A.	681,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,3	3,3	3,3	26,7	11,7	43,3	108,3
FECR (%)		100	100	100	100	100	99,5	99,5	99,5	96,1	98,3	93,6	84,1
Var. Rid.		-	-	-	-	-	0,4	0,4	1,0	0,1	0,5	0,3	0,4
95%CI sup.		-	-	-	-	-	99,9	99,9	99,9	98,2	99,6	98,0	95,6
95% CI inf.		-	-	-	-	-	98,1	98,1	96,0	91,4	92,3	80,3	42,0
		EFF	EFF	EFF	EFF	EFF	EFF	EFF	EFF	SR	EFF	R	R

M.A.:media aritmetica; FECR=*faecal egg count reduction*; Var.. Rid.: variazione riduzione; 95% C.I. sup.: intervallo di confidenza superiore; 95% C.I. inf.: intervallo di confidenza inferiore; EFF: efficace; SR: sospetta resistenza; R: resistente.

Effetti del Pyrantel, del Febendazolo, dell'Ivermectina e della Moxidectina sulla *Faecal Egg Count* e sull'*Egg Reappearance Period* negli asini

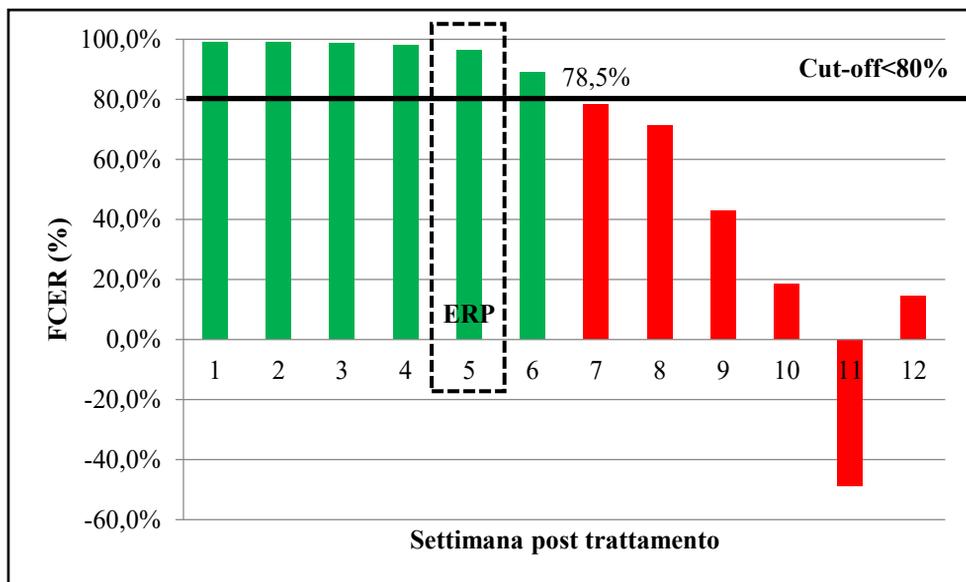


Grafico 7.1 Azienda A: valori ERP del PYR cut off 80%

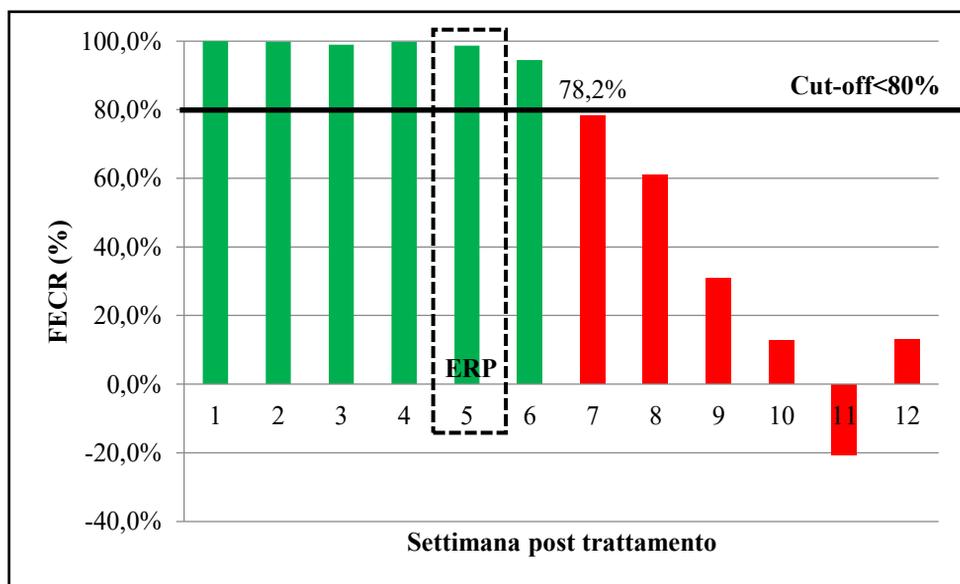


Grafico 7.2 Azienda A: valori ERP del FBZ cut off 80%

Effetti del Pyrantel, del Febendazolo, dell'Ivermectina e della Moxidectina sulla *Faecal Egg Count* e sull'*Egg Reappearance Period* negli asini

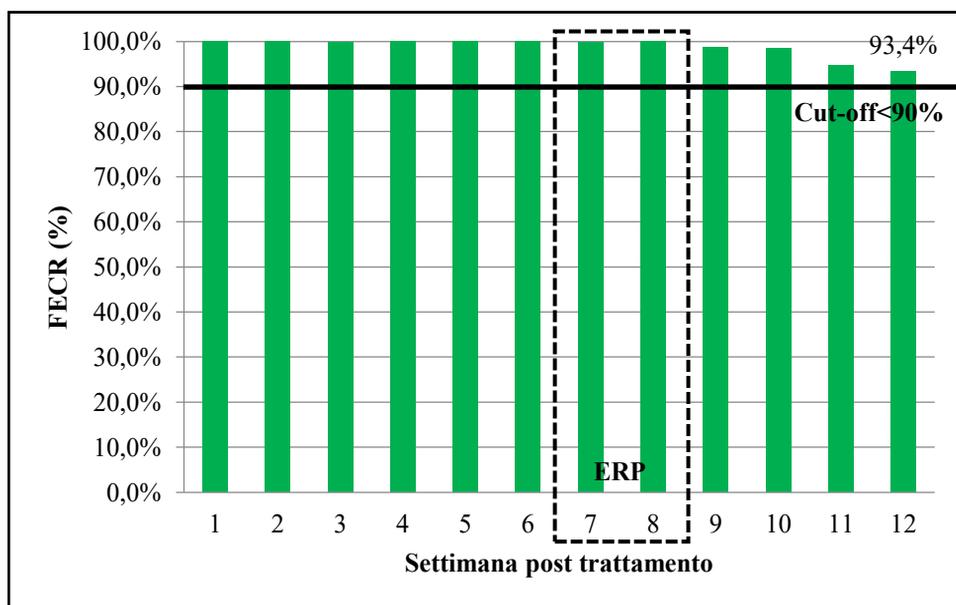


Grafico 7.3 Azienda A: valori ERP dell' IVM cut off 90%

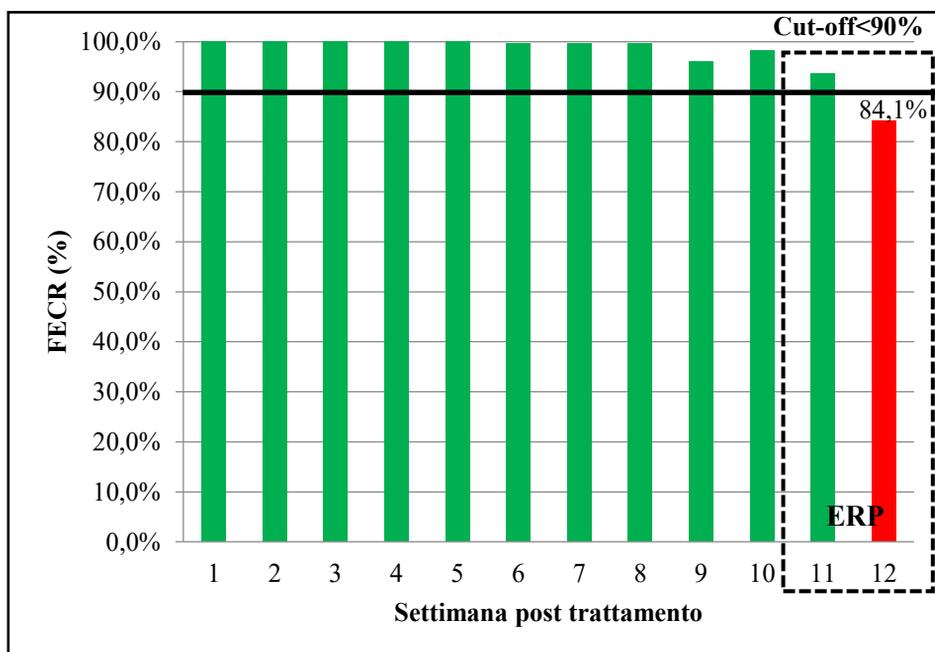


Grafico 7.4 Azienda A: valori ERP della MOX cut off 90%

Effetti del Pyrantel, del Febendazolo, dell'Ivermectina e della Moxidectina sulla *Faecal Egg Count* e sull'*Egg Reappearance Period* negli asini

Tab. 7.7 Efficacia del PYR nell'azienda "B"

Settimana	0	+1	+2	+3	+4	+5	+6	+7	+8	+9	+10	+11	+12
N° asini	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
M.A.	850	81,7	116,7	180,8	166,7	260,0	588,3	638,3	1236,7	1294,2	1725,0	1509,6	1651,7
FECR (%)		90,4	86,3	78,7	80,4	69,4	30,8	24,9	-45,5	-52,3	-102,9	-77,6	-94,3
Var. Rid.		0,2	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
95% CI sup.		96,5	94,7	92,2	93,3	86,9	70,9	61,5	20,7	12,8	-8,6	1,6	-6,0
95% CI inf.		73,9	64,3	41,7	42,4	28,7	-64,8	-46,4	-166,9	-165,8	-279,1	-220,4	-256,1
		EFF	SR	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

M.A.:media aritmetica; FECR=*faecal egg count reduction*; Var.. Rid.: variazione riduzione; 95% C.I. sup.: intervallo di confidenza superiore; 95% C.I. inf.: intervallo di confidenza inferiore; EFF: efficace; SR: sospetta resistenza; R: resistente.

Tab. 7.8 Efficacia del FBZ nell'azienda "B"

Settimana	0	+1	+2	+3	+4	+5	+6	+7	+8	+9	+10	+11	+12
N° asini	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
M.A.	640	180	103,3	298,3	293,3	253,3	316,7	486,7	461,7	467,5	493,8	481,7	553,3
FECR (%)		71,9	83,9	53,4	54,2	60,4	50,5	24,0	27,9	27,0	22,8	24,7	13,5
Var. Rid.		0,9	0,8	0,9	0,9	0,8	0,3	0,5	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1
95% CI sup.		96,2	97,5	93,8	93,8	93,9	84,5	82,9	66,8	66,4	65,9	60,7	59,7
95% CI inf.		-109,4	-4,9	-251,2	-240,4	-157,6	-58,4	-238,8	-56,5	-58,7	-74,5	-43,9	-85,6
		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

M.A.:media aritmetica; FECR=*faecal egg count reduction*; Var.. Rid.: variazione riduzione; 95% C.I. sup.: intervallo di confidenza superiore; 95% C.I. inf.: intervallo di confidenza inferiore; EFF: efficace; SR: sospetta resistenza; R: resistente.

Effetti del Pyrantel, del Febendazolo, dell'Ivermectina e della Moxidectina sulla *Faecal Egg Count* e sull'*Egg Reappearance Period* negli asini

Tab. 7.9 Efficacia dell'IVM nell'azienda "B"

Settimana	0	+1	+2	+3	+4	+5	+6	+7	+8	+9	+10	+11	+12
N° asini	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
M.A.	813,3	0,0	0,0	0,0	0,0	3,3	6,7	15,0	86,7	130,0	105,0	117,5	160,0
FECR (%)		100	100	100	100	99,6	99,2	98,2	89,3	84,0	87,1	85,6	80,3
Var. Rid.		-	-	-	-	0,6	0,3	0,5	0,3	0,3	0,3	0,2	0,3
95% CI sup.		-	-	-	-	99,9	99,7	99,6	96,7	95,0	95,6	94,9	93,2
95% CI inf.		-	-	-	-	98,0	97,5	91,8	65,7	48,9	61,9	59,1	43,2
		EFF	EFF	EFF	EFF	EFF	EFF	EFF	R	R	R	R	R

M.A.:media aritmetica; FECR=*faecal egg count reduction*; Var.. Rid.: variazione riduzione; 95% C.I. sup.: intervallo di confidenza superiore; 95% C.I. inf.: intervallo di confidenza inferiore; EFF: efficace; SR: sospetta resistenza; R: resistente.

Tab. 7.10 Efficacia della MOX nell'azienda "B"

Settimana	0	+1	+2	+3	+4	+5	+6	+7	+8	+9	+10	+11	+12
N° asini	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
M.A.	993,3	0,0	0,0	0,0	0,0	3,3	18,3	50,0	96,7	103,3	228,3	165,8	195,0
FECR (%)		100	100	100	100	99,7	98,2	95,0	90,3	89,6	77,0	83,3	80,4
Var. Rid.		-	-	-	-	1,1	0,7	0,4	0,4	0,4	0,3	0,3	0,3
95% CI sup.		-	-	-	-	100	99,7	98,7	97,3	97,4	92,7	95,0	93,3
95% CI inf.		-	-	-	-	96,9	88,8	81,1	64,3	58,2	27,8	43,8	42,6
		EFF	EFF	EFF	EFF	EFF	EFF	SR	SR	R	R	R	R

Effetti del Pyrantel, del Febendazolo, dell'Ivermectina e della Moxidectina sulla *Faecal Egg Count* e sull'*Egg Reappearance Period* negli asini

M.A.:media aritmetica; FECR=*faecal egg count reduction*; Var.: variazione riduzione; 95% C.I. sup.: intervallo di confidenza superiore; 95% C.I. inf.: intervallo di confidenza inferiore; EFF: efficace; SR: sospetta resistenza; R: resistente.

Effetti del Pyrantel, del Febendazolo, dell'Ivermectina e della Moxidectina sulla *Faecal Egg Count* e sull'*Egg Reappearance Period* negli asini

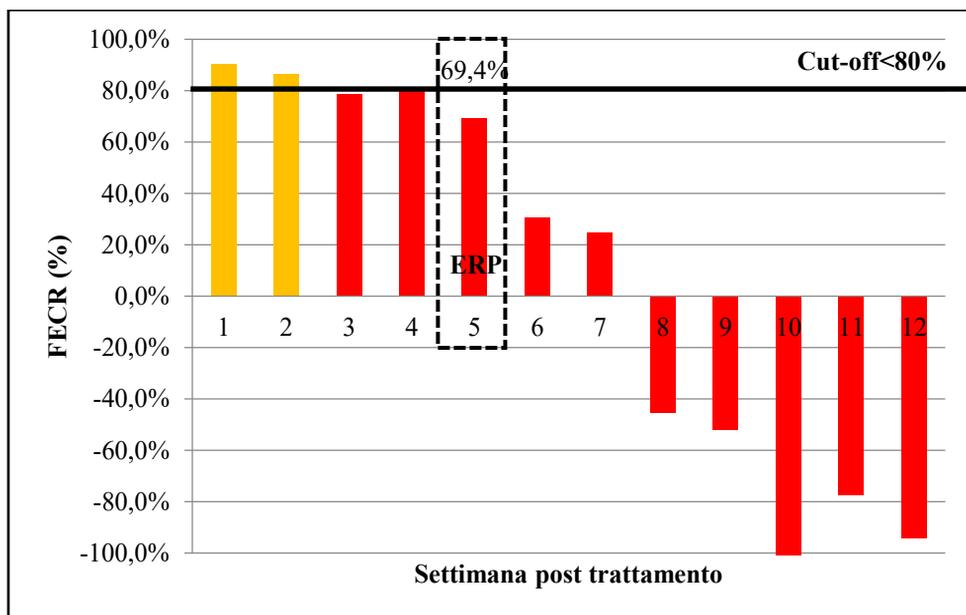


Grafico 7.5 Azienda B: valori ERP del PYR cut off 80%

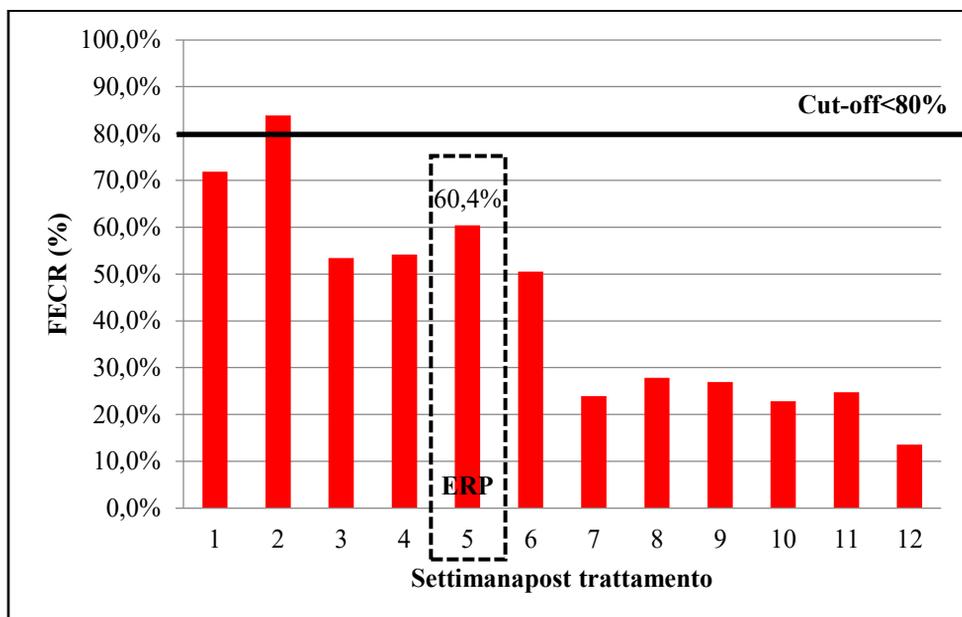


Grafico 7.6 Azienda B: valori ERP del FBZ cut off 80%

Effetti del Pyrantel, del Febendazolo, dell'Ivermectina e della Moxidectina sulla *Faecal Egg Count* e sull'*Egg Reappearance Period* negli asini

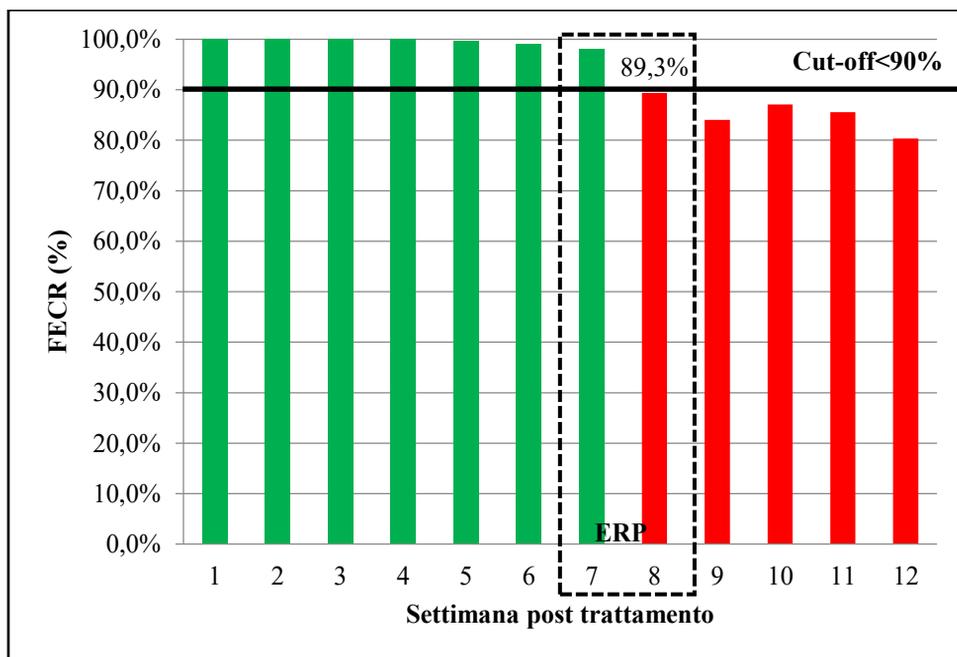


Grafico 7.7 Azienda B: valori ERP della IVM cut off 90%

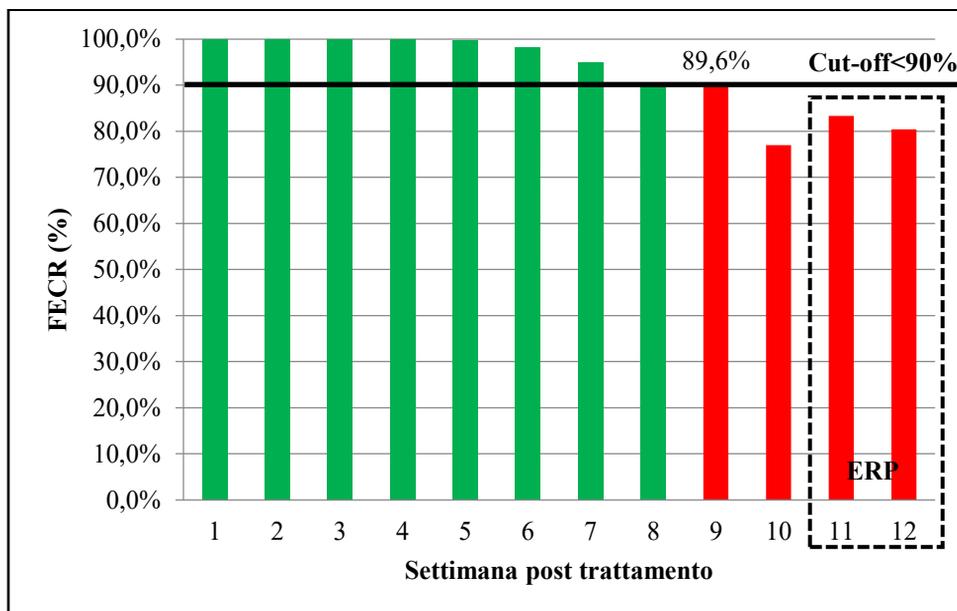


Grafico 7.8 Azienda B: valori ERP della MOX cut off 90%

7.4 Discussioni e conclusioni

La presente prova clinica ha valutato l'efficacia antiparassitaria del Pyrantel, del Febendazolo, dell'Ivermectina e della Moxidectina, in seguito a somministrazione *per os* alla stessa dose utilizzata nei cavalli, nei confronti degli strongili intestinali in due aziende asinine localizzate rispettivamente nel centro e sud Italia.

In entrambe le aziende gli animali sottoposti a trattamento antiparassitario non hanno mostrato reazioni avverse ai farmaci testati durante l'intero periodo in cui si è svolta la prova.

Nell'azienda "A" tutte le molecole testate si sono dimostrate efficaci nel trattamento delle strongilosi nell'asino, inoltre i valori di ERP si sono dimostrati in linea con quanto suggerito dalle linee guida. Nello specifico il PYR, il FBZ, l'IVM e la MOX hanno presentato, a due settimane post trattamento, un valore di FECR rispettivamente del 99,3%, 99,8%, 100% e 100%.

Nell'azienda "B" il PYR ed il FBZ hanno dimostrato una sospetta resistenza ed un'inefficacia trattamento delle strongilosi nell'asino riportando un valore di FECR, a due settimane post trattamento, rispettivamente del 86,3% e dell'83,9%.

I LM seppure efficaci nel controllo delle parassitosi (FECR=100% dopo due settimane dal trattamento antiparassitario) hanno presentato valori di ERP inferiori al cut-off suggerito dalle linee guida, presentando una FECR<90% rispettivamente alla 8° e alla 9° settimana post trattamento.

Gli esami copro-culturali hanno evidenziato prima dei trattamenti la presenza di L3 di Cyathostominae e di *Strongylus vulgaris* sia nella azienda A che azienda B. Successivamente al trattamento antiparassitario sono state evidenziate in entrambe le aziende esclusivamente larve di Cyathostominae (figura 7.4 e 7.5).



Fig. 7.4 Larva di terzo stadio di Cyathostominae (Foto F. Buono)



Fig. 7.5 Larva di terzo stadio di S. vulgaris (Foto F. Buono)

I dati da noi ottenuti nel corso di questa prova sperimentale evidenziano la presenza, nell'azienda "B", di popolazioni di CY con sospetta resistenza al PYR e resistenza al FBZ ed una iniziale ridotta efficacia da parte dei lattoni macrociclici (IVM e MOX) con un ERP inferiore. Questi risultati differiscono da quanto riportato da Veneziano et al. (2013) nel corso di una prova clinica condotta su 14 asini in cui è stata valutata l'efficacia del FBZ drench. Nel corso di questa prova gli asini sono stati suddivisi in due gruppi: C-group (non trattato) e P-group (trattato con FBZ drench al dosaggio utilizzato per i cavalli di 7,5 mg/kg p.v. L'efficacia farmacologica di questa molecola si è mantenuta pari al 100% sino al 35° giorno post trattamento.

Binev et al. (2005) hanno dimostrato l'efficacia dell'ivermectina somministrata per via SC nei confronti degli strongili intestinali in asini allevati in diverse regioni della Bulgaria. Duecentosessantatré asini sono stati sottoposti a trattamento antiparassitario con IVM (10mg/ml) alla dose di 0,2 mg/kg p.v. Gli esami coprologici effettuati dopo 14 giorni dal trattamento antiparassitario hanno evidenziato una FECR media pari al 96% con una completa scomparsa delle uova dalle feci (UPG=0) nel 92,2% degli asini.

Uno studio analogo (Imam et al., 2010) ha valutato l'efficacia terapeutica dell'albendazolo e dell'ivermectina in formulazione drench nei confronti dei nematodi gastrointestinali nell'asino. Nel corso dello studio, ventiquattro asini sono stati suddivisi in quattro gruppi sperimentali e trattati rispettivamente con albendazolo al dosaggio di 10 mg/kg, in un'unica somministrazione; albendazolo al dosaggio di 10 mg/kg in due somministrazioni a distanza di 14 giorni; ivermectina al dosaggio di 200 µg/kg p.v. in un'unica somministrazione. L'efficacia farmacologica è stata calcolata sino al giorno dell'eutanasia degli asini (21° giorno post trattamento) ed è stata pari al 100% per tutti i gruppi. In seguito agli esami necroscopici è emerso con i *Controlled Test* che nel gruppo che ha ricevuto un'unica dose di albendazolo e nel gruppo che ha ricevuto due dosi di albendazolo l'efficacia è stata rispettivamente del 97,13% e del 98,90% se paragonati ai gruppi controllo; tuttavia l'efficacia nei confronti delle L4 di *S. vulgaris* rinvenute nell'arteria mesenterica craniale è stata rispettivamente del 33% e del 59,08%. Di contro l'IVM ha presentato un'efficacia nei confronti delle L4 di *S. vulgaris* pari al 62,71%.

L'efficacia antiparassitaria dell'IVM e della MOX negli asini è stata ancora valutata nel corso di una prova clinica di campo (Fangama et al.,

2013). Ventiquattro asini sono stati suddivisi in 4 gruppi di trattamento e sottoposti a trattamento antiparassitario rispettivamente con MOX per via SC al dosaggio di 0,2 mg/kg p.v.; MOX per via IM al dosaggio di 0,2 mg/kg P.V.; IVM per via SC al dosaggio di 200 µg/kg P.V. L'efficacia antiparassitaria, valutata dopo quattordici giorni dal trattamento è stata del 90,9%, 78,5% e del 100% rispettivamente per gli asini trattati con MOX per via SC, MOX per via IM e IVM per via SC.

Gokbulut et al. (2014) hanno valutato l'efficacia farmacologica del PYR pasta e del PYR granulato in seguito a trattamento antiparassitario in asini naturalmente infettati da strongili intestinale. Ventuno asini sono stati suddivisi in tre gruppi sperimentali: un gruppo controllo, non sottoposto a trattamento antiparassitario; un gruppo sottoposto a trattamento antiparassitario con PYR pasta ed un gruppo sottoposto a trattamento antiparassitario con PYR granulato. L'efficacia farmacologica di questa molecola, sia somministrata in formulazione pasta, sia in formulazione granulare, è stata elevata (FECR>95%) sino al giorno 28. Le coproculture effettuate prima del trattamento antiparassitario hanno evidenziato la presenza sia di cyathostomi sia di *S. vulgaris*; mentre le coproculture effettuate successivamente al trattamento hanno dimostrato esclusivamente la presenza di poche larve di cyathostomi.

L'efficacia del PYR nei confronti degli strongili intestinali è stata inoltre valutata da Lawson et al. (2015) in due aziende asinine (A e B) in Inghilterra. Nell'azienda (A) sono stati sottoposti a trattamento antiparassitario 32 asini (12 femmine e 20 maschi) ed in seguito al trattamento antiparassitario la percentuale media di riduzione ottenuta in seguito a FECRT è stata del 72% (95% CI). Sei asini (19%) hanno presentato una FECR \geq 95%; 12 asini (38%) hanno presentato una FECR \geq 90% mentre 14 (44%) hanno presentato una FECR \geq 80%. Nell'azienda (B), sono stati sottoposti a trattamento antiparassitario 22 asini (11 femmine ed 11 maschi). In questa azienda, la percentuale media di riduzione è stata del 70% (95%). Nello specifico 6 di 22 asini (27%) hanno presentato una FECR \geq 95%; 8 (36%) hanno presentato una FECR \geq 90% mentre 13 (59%) hanno presentato una FECR \geq 80%. Questo studio ha quindi evidenziato, in entrambe le aziende la presenza di popolazioni di cyathostomi resistenti al PYR; infatti, la percentuale media di riduzione è stata inferiore al 90%. Questi dati differiscono da quanto riportato da Napoli et al. (2013) che hanno riportato in seguito a trattamento antiparassitario un'efficacia del PYR e dell'epinomectina

rispettivamente del 93% e del 99,6% suggerendo quindi un'elevata efficacia nei confronti degli strongili intestinali di entrambe le molecole.

La resistenza al PYR ed al FBZ e la diminuzione dell'ERP dell'IVM e della MOX, osservata nel corso di questo studio nell'azienda "B", potrebbe essere dovuta all'elevata frequenza dei trattamenti antiparassitari e l'utilizzo extra label di antielmintici registrati per altre specie animali, principalmente ruminanti.

Alla luce di questi primi studi sull'ERP nell'asino, è necessario ampliare la valutazione dei test di efficacia e di associare il calcolo degli ERP in diverse realtà dove si allevano equidi.

I risultati presentati in questa tesi di dottorato sulle principali elmintosi degli asini hanno permesso di evidenziare la presenza di un quadro parassitologico simile a quello descritto nei cavalli negli anni 80-90, evidenziando la necessità di sviluppare studi di efficacia e di farmacocinetica specifici per la specie asinina.

Infine lo studio della valutazione della ERP, ha fornito evidenze di una iniziale riduzione dei valori di ERP dopo trattamento con ivermectina e moxidectina anche negli asini. Questo dato è in accordo con altri recenti report di ERP ridotti nei cavalli dopo trattamento con lattoni macrociclici (Tzelos et al., 2017; Bellaw et al., 2017).

Nei prossimi anni il binomio FECRT e ERP sarà imperativo per poter valutare la reale presenza di antielmintico resistenza nei cavalli e negli asini.

Bibliografia

- Bellaw, J.L., Krebs, K., Reinemeyer, C.R., Norris, J.K., Scare, J.A., Pagano, S., Nielse, M.K. (2017). Anthelmintic therapy of equine cyathostomin nematodes – larvicidal efficacy, egg reappearance period, and drug resistance. *International Journal for Parasitology*, <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2017.08.009>
- Bevilaqua, C.M.L., de Rodrigues, L.M., Concordet, D. (1993). Identification of infective larvae of some common nematode strongylids of horses. *Revue de Médecine Veterinaire*, 144(12): 898-995.
- Binev, R., Kirkova, Z., Nikolov, J., Russenov, A., Stojanchev, K., Lazarov, L., Hristov, T. (2005). Efficacy of parenteral administration of ivermectin in the control of strongyloidosis in donkeys. *Journal of the South African Veterinary Association*, 76(4): 214-216.
- Boersema, J.H., Borgsteede, F.H.M., Eysker, M., Saedt, I. (1995). The reappearance of strongyle eggs in feces of horses treated with pyrantel embonate. *Veterinary Quarterly*, 17: 18-20.
- Boersema, J.H., Eysker, M., Mass, J., van der Aar W.M. (1996). Comparison of the reappearance of strongyle eggs in foals, yearlings, and adult horses after treatment with ivermectin or pyrantel. *Veterinary Quarterly*, 18: 7-9.
- Borgsteede, F.H.M., Boersma, J.H., Gaasenbeek, C.P.H., Vanderburg, W.P.J. (1993). The reappearance of eggs in feces of horses after treatment with ivermectin. *Veterinary Quarterly*, 15: 24-26.
- Cringoli G., Rinaldi L., Venenziano V., Capelli G., Scala A., (2004) The influence of flotation solution, sample dilution and the choice of McMaster slide area (volume) on the reliability of the McMaster technique in estimating the faecal egg counts of gastrointestinal strongyles and *Dicrocoelium dendriticum* in sheep. *Veterinary Parasitology*, 123 (1/2), 121-131.
- Demeulenaere, D., Vercruyse, J., Dorny, P., Claerebout, E. (1997). Comparative studies of ivermectin and moxidectin in the control of naturally acquired cyathostome infections in horses. *Veterinary Record*, 15: 383–386.
- DiPietro, J.A., Hutchens, D.E., Lock, T.F., Walker, K., Pau, A.J., Shipley, C., Rulli, D. (1997). Clinical trial of moxidectin oral gel in horses. *Veterinary Parasitology*, 72: 167–177.
- Fangama, M.I., Seri, H.I., Suliman, S.E., Imam, S.M.A., Mozamel, E.A. (2013). Comparative efficacy evaluation of moxidectin and ivermectin injectable formulation against helminthes infestation of donkeys (*Equus asinus*) in Sudan. *Assiut Veterinary Medical Journal*, 59(137): 1-8.
- Genchi, M., Traldi, G., Genchi, C. (2014). Manuale di Parassitologia Veterinaria. Casa Editrice Ambrosiana.
- Gokbulut, C., Aksit, D., Smaldone, G., Mariani, U., Veneziano, V. (2014). Plasma pharmacokinetics, faecal excretion and efficacy of pyrantel pamoate pasta and granule formulations following *per os* administration in donkeys naturally infected with intestinal strongylidae. *Veterinary Parasitology*, (1-2): 186-192.
- Gokbulut, C., Aksit, D., Satoro, M., Roncoroni, C., Mariani, U., Buono, F., Rufrano, D., Fagiolo, A., Veneziano, V. (2016). Plasma disposition, milk excretion and parasitological efficacy of mebendazole in dokeys naturally infected by Chyathostominae. *Veterinary Parasitology*, 217: 95-100.

- Grosenbaugh, D.A., Reinemeyer, C.R., Figueiredo, M.D. (2011). Pharmacology and therapeutics in donkeys. *Equine Veterinary Education*, 23: 523-530.
- Imam, S.M.A., Seri, H.I., Hassan, T., Tigani, T.A., Zolain, H.B., Abakar, A.D. (2010). Therapeutic efficacy evaluation of anthelmintics activity of albendazole and ivermectin drench formulations in donkeys in Darfur, Sudan. *Veterinarski Arhiv*, 80(5): 585-595.
- Jacobs, D.E., Hutchinson, M.J., Parker, L., Gibbons, L.M. (1995). Equine cyathostome infection. Suppression of faecal egg output with moxidectin. *Veterinary Record*, 137: 545.
- Lawson, E., Burden, F., Elsheikha, H.M. (2015). Pyrantel resistance in two herds in the UK. *Veterinary Parasitology*, 207: 346-349.
- M.A.F.F.: Manual of veterinary parasitological laboratory techniques, 1986-
- Mathews, J.B. (2014). Anthelmintic resistance in equine nematodes. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 4(3): 310-315.
- McBeath, D.G., Best, J.M., Preston, N.K., Duncan, J.L. (1978). Studies on the faecal egg output of horses after treatment with fenbendazole. *Equine Veterinary Journal*, 10: 5-8.
- Napoli, E., Gaglio, G., Falsone, L., Ferrara, M.C., Brianti, E., Giannetto, S. (2013). Utilizzo dell'epinomectina e del pyrantel pamoato nell'asino: valutazione dell'efficacia antielmintica. *Large Animal Review*, 19: 123-126.
- Nielsen, M.K., Mittel, L., Grice, A., Erskine, M., Graves, E., Vaala, W., Tully, R.C., French, D.D., Bowman, R., Kaplan, R.M. (2013). AAEP Parasite Control Guidelines. *American Association of Equine Practitioners*. On-line at www.aaep.org.
- Peregrine, A.S., Molento, M.B., Kaplan, R.M., Nielsen, M.K. (2014). Anthelmintic resistance in important parasite of horses: Does it really matter? *Veterinary Parasitology*, 201 (1-2): 1-8.
- Porr, C.A.S., Hedinger, V.F., Hamm, L.R., Ernst, M.M., Papajeski, B.M., Santiago, M.L., Davis, A.J. (2017). Effects of ivermectin and moxidectin on fecal egg count and egg reappearance rate in horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, 57: 51-55.
- Reinemeyer, C.R. e Clymer, B.C. (2002). Comparative efficiency of moxidectin gel or ivermectin paste for cyathostome control in young horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, 22: 33-36.
- Tzelos, T. e Matthews, J.B. (2016). Anthelmintic resistance in equine helminths and mitigating its effects. *In Practice*, 38: 489-499.
- Tzelos, T., Barbeito, J.S.G., Nielsen, M.K., Morgan, E.R., Hodgkinson, J.E., Matthews, J.B. (2017). Strongyle egg reappearance period after moxidectin treatment and its relationship with management factors in UK equine populations. *Veterinary Parasitology*, 237: 70-76.
- Uhlinger, C. (2010). Effects of three anthelmintic schedules on the incidence of colic in horses. *Equine Veterinary Journal*, 22: 251-254.
- Veneziano, V., Gallo, A., Masucci, R., Benedetto, D., Neola, B., Pasolini, M.P., Gokbulut, C. (2013). Clinical trial on the efficacy and safety of fenbendazole oral suspension (Panacur, 10%) on donkeys naturally infected by intestinal strongyle. In: XIX SIVR International Congress, Abstract Book. p. 177. Arezzo, 1-3 febbraio 2013.
- Vidyashankar, A.N., Hanlon, B.M., Kaplan, R.M. (2012). Statistical and biological considerations in evaluating drug efficacy in equine strongyle parasites using fecal egg count data. *Veterinary Parasitology*, 185: 45-56.

Zajac, A.M. e Conboy, G.A. (2012). Storage and shipment of feca samples. *In: Veterinary clinical parasitology*. (8th ed.). West Sussex, UK: WileyBlackwell. p. 4.

Capitolo 8

Appendici

Igiene dell'asino (brusca, striglia, doccia, pulizia zoccoli) no si
 Frequenza: sporadica mensile settimanale giornaliera più volte al giorno
 Rimozione delle uova di *Gasterophilus*: NO SI Pulizia della regione perianale: NO SI

Alimentazione

concentrati fieno integratori erba di sfalcio

Vengono praticati trattamenti antelmintici?

SI NO se si: Individuali Per categoria Tutti

Vuoto sanitario dopo trattamento antelmintico: SI NO

Trattamento dei nuovi arrivi: SI NO

Frequenza dei trattamenti: Annuale Ogni 6 mesi Ogni 4 mesi Ogni 3 mesi

Ogni 2 mesi Mensile

Se SI Indicare il numero dei trattamenti nell'anno _____ e verso quali parassiti e con quale farmaco

PARASSITOSI	MESI DELL'ANNO											
	G	F	M	A	M	G	L	A	S	O	N	D
GS (<i>Strongylus</i>)												
PS (<i>Cyathostom</i>)												
<i>Parascaris equorum</i>												
SP (<i>Dyctiocaulus</i>)												
<i>Gasterophilus</i>												
Tenie												
Ectoparassiti (zecche e pidocchi)												

Quali dei seguenti farmaci vengono impiegati? (segnare nella tabella)

- Ivermectina (Eqvalan, Eraquell, F. Mectin, Maximec)
- Moxidectina (Equest)
- Benzimidazolici (Panacur, Telmin)
- Pyrantel (Strike, Strongid, Antelmintico candioli)
- Praziquantel (Droncit 9%)
- Ivermectina/Praziquantel (Eqvalan Duo, Equimax)
- Moxidectina/Praziquantel (Equest pramox)
- Prodotti omeopatici - specificare _____
- Non ricordo
- Altro - specificare _____

Trattamento con farmaci iniettabili? (es. registrati per bovini - Ivomec): si no

Trattamento specifico per le tenie? SI - prodotto usato _____
 No

Treatmento specifico per le larve incistate
dei Ciatostomi? Non so
 SI – prodotto usato _____
 No
 Non so

Dopo il trattamento gli animali pascolano sullo stesso pascolo: SI NO

Conosci il concetto di refugia? SI NO Conosci il concetto di resistenza? SI NO

I puledri vengono trattati come gli adulti SI NO
Se NO: entro 2 mesi durante l'allattamento allo svezzamento

Rotazione degli antelmintici: NO SI se si: Annuale Ogni 6 mesi Più spesso

chi pratica il trattamento:

proprietario uomo di scuderia veterinario altro _____

Calcolo della dose:

intera siringa con valutazione visiva con nastro in base all'età altro _____

Consideri importante ricevere informazioni sui trattamenti antelmintici: si no

Se si da chi veterinario informatore del farmaco farmacisti esperti del settore
altri proprietari depliant internet riviste specializzate altro _____

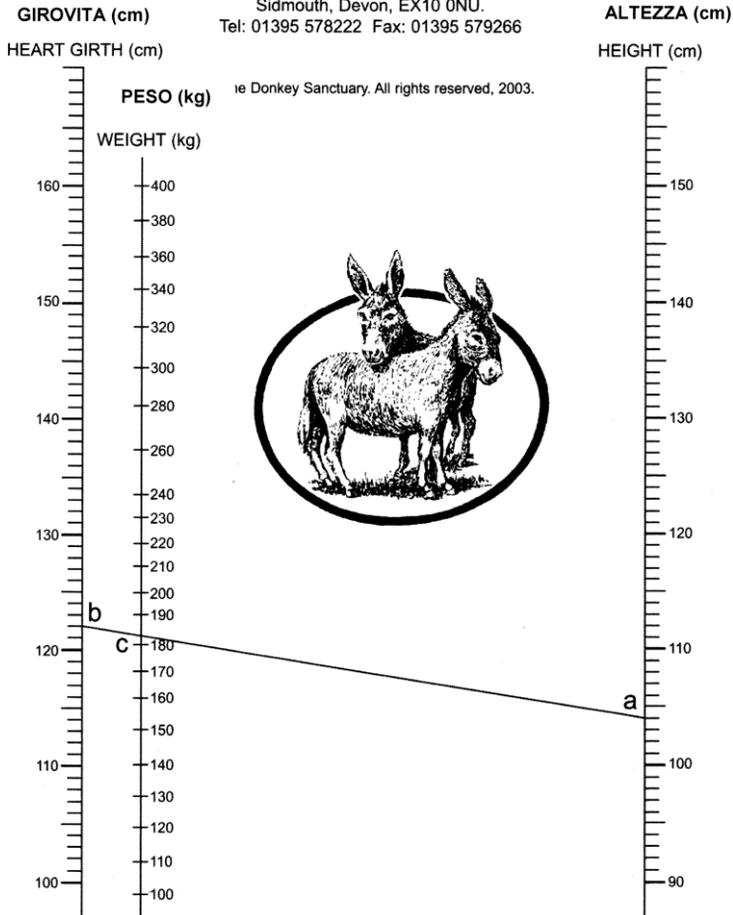
Motivazioni del trattamento: Diagnosi coprologica Sintomi Scarse performance
Cadenzato/strategico [dopo il parto (per le fattrici) - allo svezzamento (per i puledri)
su indicazione del veterinario curante altro _____

Quali sintomi associ alle parassitosi:
coliche ricorrenti coda grattata diarrea dimagrimento riduzione della
performance

APPENDICE II: *Nomogramma per la determinazione del peso degli asini*

The Donkey Sanctuary

Sidmouth, Devon, EX10 0NU.
Tel: 01395 578222 Fax: 01395 579266



Un asino alto 104cm (a) e con un girovita di 122cm (b) dovrebbe pesare 181 kg (c).
Il nomogramma è preciso nell'ordine dei 10 kilogrammi.

Tabella di peso per asini sotto i 2 anni:

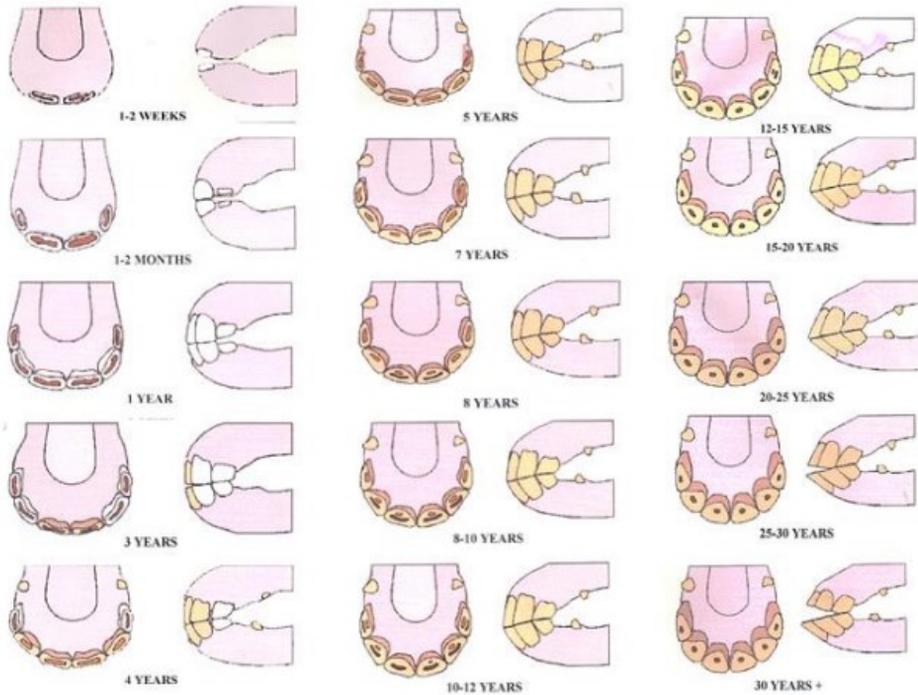
Girovita m	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
Peso kg	46	47	49	51	53	55	57	59	61	63	65	67	69	71	74	76	78	81	83	86	88	91	94	96	99	102

Per l'asino adulto: peso=0,000252 x altezza^{0,240} x girovita^{2,575}
Per l'asino sotto i 2 anni: peso=0,000283 x girovita^{2,778}

© The Donkey Sanctuary

APPENDICE III: Guida alla determinazione dell'età degli asini

L'età degli asini può essere valutata attraverso l'osservazione dei denti incisivi. Fino ai 10 anni l'età può essere stimata in modo abbastanza preciso.

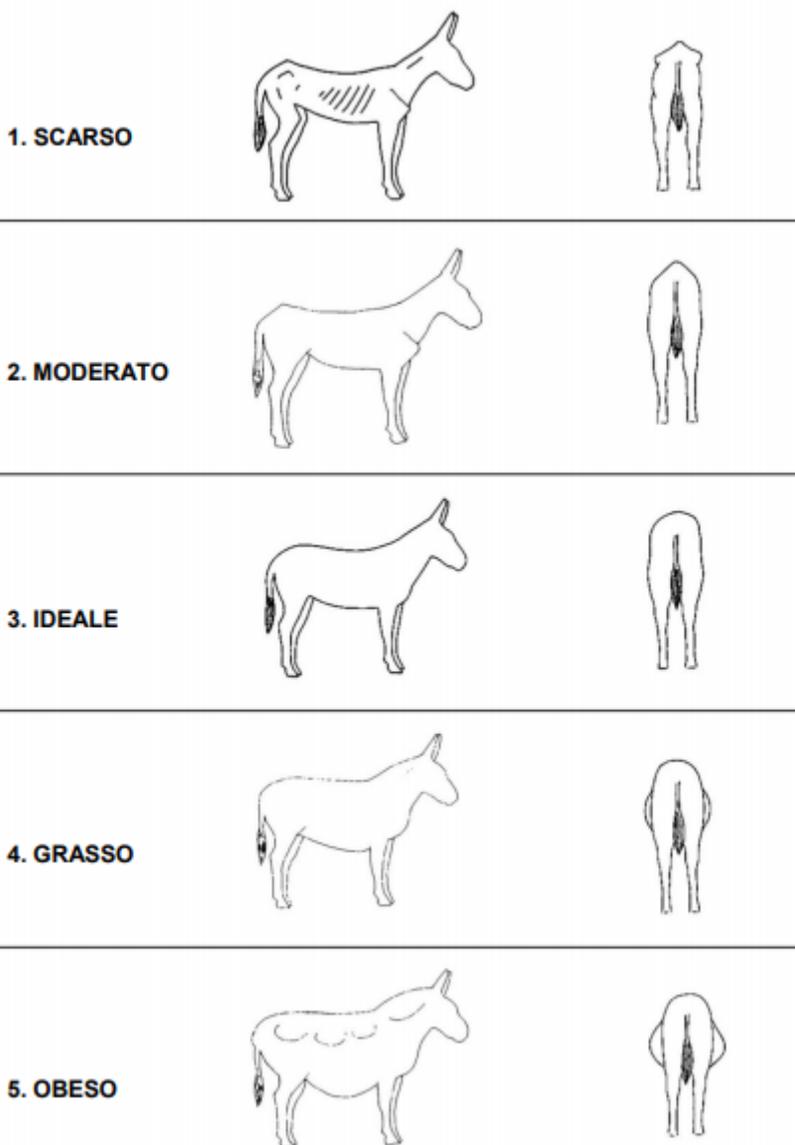


Tempo di eruzione degli incisivi:

	Decidui	Permanenti
Piccozzi	0-1 settimana	2,5 anni
Mediani	2-4 settimane	3,5 anni
Cantoni	7-9 mesi	4,5 anni

Modificato Da: <https://www.donkeysanctuarycyprus.org/sites/cyprus/files/page/60-1492760833.pdf>

APPENDICE IV: Guida alla determinazione del BCS



I depositi di grasso possono essere distribuiti in modo irregolare, specialmente sulle spalle e sui quarti posteriori. Alcuni depositi più resistenti possono persistere anche nonostante una perdita di peso e possono calcificarsi. Bisogna effettuare una attenta valutazione di tutte le aree per poter effettuare una valutazione complessiva.

APPENDICI

Tab. 8.1. Caratteristiche e definizioni del BCS.

Bcs	Collo e spalle	Garrese	Costole e pancia	Dorso e lombi	Quarti posteriori
1.Scarso	Collo magro, tutte le ossa sono facilmente palpabili. Il collo si congiunge alle spalle con un angolo evidente. Le ossa delle spalle sono spigolose, facilmente palpabili.	Spina dorsale all'altezza del garrese pronunciata e facilmente palpabile.	Costole visibili a distanza e facilmente palpabili. Pancia rientrante.	Vetebre pronunciate, processi trasversi e dorsali facilmente palpabili.	Ossa dei fianchi visibili e facilmente palpabili (garretto e anche). Sottile copertura muscolare. Potrebbe essere presente una cavità al di sotto della coda.
2.Moderato	Leggero sviluppo muscolare a coprire l'ossatura. Rilevabile piccolo incavo nel punto d'incontro tra spalle e collo.	Leggero rivestimento sulla parte dorsale, vertebre palpabili, ma non pronunciate.	Costole non visibili, ma facilmente palpabili.	Processi trasversi e dorsali palpabili con una leggera pressione. Scarso sviluppo muscolare su entrambi i lati della colonna.	Scarso strato muscolare sui quarti posteriori, ossa dei fianchi facilmente palpabili.
3.Ideale	Buono sviluppo muscolare, ossa palpabili al di sotto di un leggero strato di muscoli/grasso. Il collo scende regolarmente verso le spalle che sono arrotondate.	Buono strato di grasso/muscolo al di sopra delle costole dorsali. Il garrese scende regolarmente verso la schiena.	Costole coperte da un leggero strato di grasso/muscoli, palpabili con una leggera pressione. Pancia tonica con un buon tono muscolare e un profilo abbastanza piatto.	Non si riscontrano a palpazione i singoli processi trasversi e spinali. Buon sviluppo muscolare su entrambi i lati della colonna.	Buona copertura muscolare sui quarti posteriori, ossa dei fianchi arrotondate nell'aspetto, palpabili con una leggera pressione.

APPENDICI

4.Grasso	Collo spesso, cresta dura, spalle coperte da uno spesso strato di grasso.	Garrese largo, ossa palpabili dietro la coscia.	Costole dorsali palpabili solo dietro decisa pressione. Costole ventrali più facili da percepire. Pancia sovrasviluppata.	Sono palpabili solo i processi trasversi e dorsali con una ferma pressione. Leggera piega lungo la colonna vertebrale.	Quarti posteriori arrotondati, ossa palpabili solo dietro forte pressione. Deposito di grasso distribuiti uniformemente.
5.Obeso	Collo spesso, cresta sporgente che può ricadere su un lato. Spalle arrotondate e sporgenti.	Garrese largo, ossa non palpabili	Considerevoli depositi di grasso, spesso non omogenei, che rivestono la parte dorsale e addominale delle costole, che non sono palpabili. Pancia cadente.	Schiena larga con processi trasversi e spinali non palpabili. Profonda piega al centro con sporgenze di grasso su entrambi i lati.	Fianchi non palpabili, sporgenze di massa grassa su entrambi i lati della coda. Grasso distribuito in modo irregolare.

Si possono assegnare mezzi punti nel caso in cui non vi sia corrispondenza con un punteggio preciso. Può risultare più difficile la valutazione del BCS in un asino anziano a causa della carenza di tono muscolare, che lo fa risultare magro a livello dorsale e con un ventre cadente, sebbene le condizioni generali possano essere accettabili.

APPENDICE V: *Tecniche di laboratorio***Conteggio in camera McMaster**

La camera McMaster è costituita da due vetrini sovrapposti distanti fra loro 1,5 mm che delimitano due camere di flottazione (18x18). Il vetrino superiore porta inciso due reticoli di lettura di forma quadrata (1 cm di lato) ciascuno suddiviso da 6 linee parallele. Ciascuna camera di flottazione delimita un volume di 0,5 ml (due camere = 1 ml), mentre ciascun reticolo di lettura elimita un volume di 0,15 ml (2 reticoli = 0,3 ml). Con la camera McMaster è possibile effettuare la stima del numero delle uova utilizzando differenti fattori di moltiplicazione in funzione della diluizione del campione e dell'area di lettura: 1 reticolo, 2 reticoli, 1 camera, 2 camere.

Materiale necessario:

- ✓ Bekers o contenitori in plastica
- ✓ Bilancia
- ✓ Cilindro misuratore
- ✓ Colino a maglie strette
- ✓ Pipette pasteur
- ✓ Centrifuga
- ✓ Soluzione flottante
- ✓ Camera McMaster
- ✓ Microscopio

Procedura:

- ✓ Pesare 3 gr di feci
- ✓ Stemperare le feci in 42 ml di acqua
- ✓ Omogenizzare accuratamente
- ✓ Filtrare la soluzione ottenuta attraverso un colino a maglie strette (250 μ m)
- ✓ Mescolare il liquido filtrato facendolo passare da un bicchiere ad un altro per almeno 7 volte e riempire una provetta da 10 ml
- ✓ Centrifugare a 2000 RPM per 10 minuti
- ✓ Versare il surnatante lasciando il sedimento nella provetta

- ✓ Mescolare il sedimento alla soluzione flottante riportando a volume iniziale di 10 ml
- ✓ Mescolare la soluzione e con una pipetta monouso prelevare circa 1,5 ml di sospensione e riempire la prima camera del vetrino McMaster; ripetere il passaggio per la seconda camera
- ✓ Attendere 10 minuti e leggere al microscopio
- ✓ Esaminare il vetrino al microscopio mettendo a fuoco in modo che le linee incise sul reticolo siano ben visibili

Per il calcolo del numero di uova per grammi di feci (upg), moltiplicare il numero di uova contate all'interno di un reticolo per 100 o per 50 se vengono contate le uova all'interno di due reticoli

Il peso, il fattore di diluizione e la soluzione flottante influiscono sulla sensibilità e sulla precisione del metodo. La diluizione delle feci e la superficie di lettura della camera McMaster determinano il fattore per il quale il numero di uova contate nella camera devono essere moltiplicate per ottenere il numero di uova, oocisti o cisti per grammo di feci.

La versione *Special modification of McMaster method* prevede gli stessi passaggi della metodica precedentemente descritta, ma utilizza una diluizione delle feci 1:10 (10 grammi di feci e 90 ml di acqua) e necessita della lettura dell'intera area delle due camere di flottazione (volume = 1 ml). In questo caso, il numero delle uova contate viene moltiplicato per 10.

Flottazione delle uova di anaplocefalidi degli equini (Proudman e Edwards, 1992)

Il *Proudman Test* è una metodica qualitativa che permette di rilevare la presenza di uova di *Anoplocephala* spp. nelle feci. Una soluzione flottante viene adoperata al fine di separare le uova dal materiale fecale.

Materiale necessario:

- ✓ Becker o contenitori in plastica
- ✓ Bilancia
- ✓ Cilindro misuratore
- ✓ Colino a maglie strette
- ✓ Pipette pasteur
- ✓ Centrifuga
- ✓ Soluzione flottante
- ✓ Bicchierino e filtro
- ✓ Vetrino portaoggetto e coprioggetto
- ✓ Microscopio

Procedura:

- ✓ Circa 40 g di feci sono poste in un becker e mescolate vigorosamente in 5-10 ml di acqua di fonte fino a raggiungere una consistenza pastosa. La sospensione è filtrata attraverso un colino a maglie larghe e raccolta in 2 provette da 10 ml
- ✓ Centrifugare entrambe le provette a 2700 rpm per 10 minuti allontanare il surnatante e risospendere il sedimento in acqua di fonte e centrifugare nuovamente
- ✓ Allontanare il surnatante e risospendere il sedimento in una soluzione di saccarosio (450 gr di zucchero in 350 ml di acqua) e centrifugare a 2700 rpm per 10 minuti
- ✓ Rimuovere le provette dalla centrifuga e in un portaprovette aggiungere la soluzione di flottazione fino al bordo e appoggiare un vetrino portaoggetti su ciascuna provetta
- ✓ Lasciare i vetrini sulla provetta per 2 ore, quindi rimuoverli e porli su un coprioggetto per l'osservazione microscopica. Osservare entrambi i vetrini

Sedimentazione in acqua

Le tecniche di sedimentazione sono utilizzate per l'osservazione di uova che a causa del peso specifico non flottano nelle soluzioni a basso peso specifico o vengono deformate dalla pressione delle soluzioni a peso specifico elevato (Genchi et al., 2014).

La tecnica di sedimentazione in acqua è una metodica qualitativa che permette di ricercare le uova di trematodi presenti nel materiale fecale.

Materiale necessario:

- ✓ Beakers o contenitori in plastica
- ✓ Bilancia
- ✓ Cilindro misuratore
- ✓ Colino a maglie strette
- ✓ Piastra di Petri
- ✓ Stereomicroscopio

Procedura:

- ✓ Mescolare circa 5 grammi di materiale fecale con 40-50 ml di acqua di fonte fino ad ottenerne una sospensione omogenea
- ✓ Versare la sospensione in un bicchiere conico da 250 ml filtrandola attraverso un setaccio (pori circa 350 μm di diametro) o una garza
- ✓ Aggiungere acqua di fonte fino a riempire quasi tutto il recipiente
- ✓ Lasciare sedimentare per circa 20 minuti
- ✓ Allontanare il surnatante per circa tre quarti del volume totale
- ✓ Aggiungere nuovamente acqua
- ✓ Dopo circa 20 minuti allontanare nuovamente il surnatante fino al sedimento avendo cura di non smuovere il fondo
- ✓ Trasferire il sedimento in una piastra di Petri (o poche gocce su un vetrino portaoggetto)
- ✓ Osservare allo stereomicroscopio a 40-60 ingrandimenti

Sedimentazione con apparato di Baermann

La metodica di Baermann sfrutta la mobilità, l'igrotropismo positivo e il peso specifico delle larve di nematodi. L'apparecchio è costituito da un imbuto al quale viene raccordato un tubo di gomma morbida (circa 10 cm) chiuso all'estremità distale.

Procedura:

- ✓ Riempire l'imbuto con acqua e immergervi le feci (10-30 grammi) avvolte da un doppio strato di garza; il campione deve essere tenuto sollevato nel liquido da una pinza oppure appoggiato su un colino in modo che non ostruisca la parte stretta dell'imbuto
- ✓ Lasciare il campione a temperatura ambiente per un tempo sufficiente alla migrazione delle larve dal materiale fecale e alla loro sedimentazione (12 ore circa)
- ✓ Allentare la pinza e raccogliere alcune gocce di sedimento direttamente su vetrino o alcuni ml di liquido in una provetta conica
- ✓ Centrifugare a 1500 giri/minuto per 10 minuti
- ✓ Eliminare il surnatante ed osservare il sedimento al microscopio

Le larve raccolte attraverso questa metodica sono vitali, per immobilizzarle e consentirne l'identificazione aggiungere una goccia di Lugol 1% al sedimento o scaldare per pochi secondi il vetrino con la fiamma di un accendino

Non utilizzare materiale fecale conservato in formalina o altri fissativi, ma solo materiale fresco o conservato a 4 °C. Se il campione è prelevato da terra possono essere presenti numerose larve o adulti i nematodi a vita libera. In alternativa all'imbuto è possibile utilizzare un bicchiere conico di vetro o plastica: le larve si depositano sul fondo da dove vanno raccolte dopo avere allontanato il surnatante.

Coprocoltura

Gran parte delle uova ed oocisti osservabili tramite l'esame copromicroscopico hanno una morfologia che è caratteristica per ciascun gruppo di parassiti. Tuttavia alcuni nematodi come i trichostrongili e gli strongili degli equini hanno uova con caratteristiche morfologiche molto simili che non ne consentono l'identificazione per genere e specie di appartenenza. In questi casi è necessario ricorrere alla messa in coltura del materiale fecale. In tal modo è possibile ottenere la schiusa delle uova e lo sviluppo della larva infettante (L3)

Procedura:

- ✓ Stemperare con una spatolina le feci in una piastra di Petri; qualora il materiale fecale fosse molto compatto deve essere sminuzzato in un mortaio ed inumedito con acqua; se le feci sono diarroiche mescolarle con torba o carbone vegetale
- ✓ Coprire la piastra con un coperchio e porla in termostato a 27° C
- ✓ Controllare il campione così allestito affinché non si disidrati durante il periodo di incubazione e nel caso aggiungere acqua, inoltre è opportuno ogni 24-48 ore aprire la piastra per permettere un'adeguata aereazione della coltura
- ✓ Dopo 7-10 giorni togliere la piastra dal termostato, capovolgerla e con una pipetta aggiungere acqua nell'intercapedine tra coperchio e piastra fino a lambire le feci sovrastanti
- ✓ Porre la piastra sotto una fonte luminosa
- ✓ Dopo circa 24 ore raccogliere la fase liquida in un contenitore, riempire una provetta e centrifugare: allontanare il surnatante, aggiungere poche gocce di Lugol e risospendere il precipitato. Le larve possono essere raccolte in un contenitore anche utilizzando l'apparato di Baermann
- ✓ Prelevare la sospensione con una pipetta Pasteur, porla tra un vetrino portaoggetto e coprioggetto e osservare al microscopio

In alternativa alle piastre Petri, le coprocolture possono essere allestite in barattoli di vetro o vaschette

Per tutte le tecniche coprocolturali non utilizzare materiale fecale conservato in formalina o altri fissativi ma solo materiale fresco o conservato a 4° C.